

1. Einleitung

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene
und Med. Mikrobiologie mit Medizinal-Untersuchungsamt der

Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H.-D. Klenk

Institut für Virologie der

Philipps-Universität Marburg

Leiter: Prof. Dr. med. H.-D. Klenk

Zur Beeinflussung der viralen Myokarditis durch
Isoprinosine und Hypercholesterinämie

Eine Akutphasestudie unter Berücksichtigung
immunologischer und virologischer Parameter

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

1. Einleitung

von

Ansgar Schultheis

aus Fulda

Marburg 1997

1. Einleitung

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin

der Philipps-Universität Marburg am 24.07.1997

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. Slenczka

1. Einleitung

Korreferent: PD Dr. Herzum

Meinen Eltern

1. Einleitung

Meinem Großvater

Gliederung

1. Einleitung

- 1.1. Zur Myokarditis
- 1.2. Epidemiologie
- 1.3. Klinik und Verlauf der virusinduzierten Myokarditis
- 1.4. Diagnose und histopathologische Befunde
- 1.5. Therapie der Virusmyokarditis
- 1.6. Grundlagen und Zielsetzung der Arbeit
- 1.7. Aufbau der Studie

2. Material und Methoden

- 2.1. Material
 - 2.1.1. Geräte
 - 2.1.2. Reagenzien
 - 2.1.3. Lösungen zur Zellkultivierung
 - 2.1.4. Lösungen für den Interferonnachweis
 - 2.1.5. Lösungen für den Plaquetest
 - 2.1.6. Lösungen für den ELISA
 - 2.1.7. Versuchstiere
 - 2.1.8. L-Zellen
 - 2.1.9. Verwendete Viren
 - 2.1.9.1. EMC-Viren

1. Einleitung

2.1.9.2. VS-Viren

2.1.10. Isoprinosine

2.1.10.1. Wirkmechanismus

2.1.10.2. Pharmakokinetik und Nebenwirkungen

2.2. Methoden

2.2.1. Einteilung und Kennzeichnung der Versuchstiere

2.2.2. Tierhaltung

2.2.3. Füttern und Therapieren der Versuchstiere

2.2.3.1. Kontrollgruppen

2.2.3.2. Mit Isoprinosine therapierte Tiere

2.2.3.3. Cholesterinreich gefütterte Tiere

2.2.3.4. Vorversuche

2.2.4. Infizieren der Tiere

2.2.5. Protokollieren des Versuchsverlaufs

2.2.6. Histopathologische Begutachtung

2.2.6.1. Organentnahme

2.2.6.2. Organaufbereitung

2.2.6.3. Begutachtung

2.2.7. Serumgewinnung

2.2.8. Sterile Organentnahme für den Plaquetest

2.2.9. Kultivieren von Zellreihen

2.2.9.1. Zellhaltung

2.2.9.2. Umsetzen von Zellen

2.2.9.3. Zellzahlbestimmung

2.2.9.4. Sterilitätsprüfungen

2.2.9.5. Mykoplasmennachweis

2.2.10. Interferonbestimmung

1. Einleitung

2.2.10.1. Vorversuche zur Interferonbestimmung

2.2.10.2. Anlage der Zellkulturen für den Interferonnachweis

2.2.10.3. Vorbereiten und Verteilen der Proben

2.2.10.4. Pipettieren des VS-Virus

2.2.10.5. Die MTT-Vitalfärbung

2.2.10.6. Photometrische Messung

2.2.10.7. Bestimmung der Interferontiter

2.2.11. Bestimmung der Viruskonzentrationen im Myokard und im Milzgewebe

2.2.11.1. Vorbereiten der Monolayer

2.2.11.2. Vorbereiten der Proben

2.2.11.3. Beschicken der Monolayer mit den Proben

2.2.11.4. Der Overlay

2.2.11.5. Kontrollansätze

2.2.11.6. Kontrolle und Färben der Platten

2.2.11.7. Auszählung und Auswertung

2.2.12. ELISA zum Antikörpernachweis

2.2.12.1. Antigenherstellung zum Coaten der Platten

2.2.12.2. Coaten der Mikrotiterplatten

2.2.12.3. Vorbereiten und Pipettieren der Proben

2.2.12.4. Auswertung

2.2.13. Neutralisationstest zur Antikörperbestimmung

2.2.13.1. Bestimmung der ID₅₀

2.2.13.2. Vorbereitung der Seren

2.2.13.3. Pipettieren der Proben

2.2.13.4. Kontrollansätze

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Intravitalbeobachtungen

1. Einleitung

3.1.1. Ergebnisse der Vorversuche

3.1.1.1. Gewichtsverlauf

3.1.1.2. Cholesterinspiegel

3.1.2. Gewichtsverläufe unter Infektion

3.1.3. Krankheitsverlauf

3.2. Ergebnisse der histopathologischen Begutachtung

3.3. Ergebnisse des Interferonnachweises

3.3.1. Ergebnisse der Vorversuche

3.3.1.1. Auswertung der Sterilitätsprüfungen

3.3.1.2. Ausgleich des Effektes von Mäuseserum auf das Zellwachstum

3.3.1.3. Auswertung der UV-bestrahlten Interferoneichreihe

3.3.1.4. Einfluß von Isoprinosine und Cholesterin auf die IFN-Produktion

3.3.2. Eichreihe

3.3.3. Ergebnisse der Serumauswertungen

3.4. Ergebnisse des Plaquetestes zur Virustiterbestimmung in Myokard und Milz

3.4.1. Ergebnisse der Vorversuche

3.4.2. Viruskonzentration im Myokard

3.4.3. Viruskonzentration im Milzgewebe

3.5. Auswertung des ELISA zum Antikörnernachweis

3.5.1. Ergebnis der Bestimmung des Proteingehalts des Antigenkonzentrats

3.5.2. Auswertung der Proben

3.6. Auswertung des Neutralisationstestes zum Antikörnernachweis

3.6.1. Bestimmung der ID₅₀

3.6.2. Auswertung der Kontrollansätze

3.6.3. Auswertung der Proben

4. Diskussion

4.1. Versuchsmodell

1. Einleitung

4.2. Ernährung der Tiere

4.3. Beobachtung der Intravitalparameter

4.4. Interferonnachweis

4.5. Plaquetest

4.6. ELISA-Test

4.7. Antikörperrnachweis

4.8. Diskussion der Ergebnisse

4.8.1. Der Einfluß der Hypercholesterinämie auf den Krankheitsverlauf

4.8.2. Der Einfluß einer Therapie mit Isoprinosine auf den Infektionsverlauf

4.9. Schlußbetrachtung

5. Zusammenfassung

6. Literatur

7. Anhang

1.

Einleitung

1.

Zur Myokarditis

Als Beginn der Myokarditisforschung wird das Erscheinen der Arbeit von CORVISAR: "Essai sur les maladies et les lesions organique du coer et des gros vaissaux" von 1808 genannt, in der erstmals eine organische Ursache für die Entstehung der chronischen Herzinsuffizienz gefordert wurde. Der Begriff der Myokarditis wurde von SOBERNHEIM 1837 geprägt. Doch erst mit der Erarbeitung der Histologie des Myokards durch KÖLLIKER 1867 sowie durch wichtige Arbeiten des Pathologen KÖSTER 1878 war die Möglichkeit gegeben, Myokardnekrosen durch Coronarsklerose, relativer Coronarinsuffizienz bei Hypertonie oder bei hämodynamisch wirksamen Klappenfehlern, früher als "Myokarditis chronica fibrosa" bezeichnet, von den eigentlichen entzündlichen Myokardschädigungen abzugrenzen.

Eine erste Einteilung der Ätiologie der Virusmyokarditis erfolgte 1947 durch SAPHIR, der Infektionen mit Viren, Bakterien, Pilzen und Protozoen als Ursache der Virusmyokarditis von spezifischen Entzündungen wie rheumatischem Fieber oder Sarkoidose und chemische Noxen wie Medikamente und Alkohol abgrenzte. Durch klinische Studien und die Aufnahme von Tierexperimenten Ende der fünfziger Jahre konnte bei fast

1. Einleitung

allen Infektionskrankheiten eine Myokardbeteiligung vermutet und teilweise auch bewiesen werden. BRIDGEN postulierte bereits 1957, daß die dilatative Cardiomyopathie durch eine virusinduzierte Myokarditis bedingt sei. Durch Untersuchungen von BOLTE und SCHULTHEISS wurde die Theorie 1977 bestätigt.

An zahlreichen Tiermodellen konnte bei guter Reproduktionsfähigkeit gezeigt werden, daß der Mehrzahl der klinisch relevanten Myokarditiden eine Viruspathogenese zugrunde liegt, wobei Picornaviren wie Coxsackie B- aber auch Coxsackie A-, Echo- und Polioviren vor allem für die dilatative Cardiomyopathie verantwortlich gemacht werden (KISHIMOTO 1985). Nicht nur zu epidemiologischen oder histopathologischen Untersuchungen, sondern auch zur Überprüfung von Therapieansätzen und zu Verlaufsbeobachtungen haben sich zahlreiche Tiermodelle etabliert (MATSUMORI 1987). In dieser Studie soll eine mögliche therapeutische Beeinflussung in der Frühphase der virusinduzierten Myokarditis an einem standardisierten Tiermodell aufgezeigt werden.

Epidemiologie

Die virale Myokarditis wird mit einer Prävalenz von 1% bis 5% angegeben, wobei die Hauptursache der sich klinisch manifestierenden Virusmyokarditiden mit 50% auf Coxsackie-Infektionen zurückzuführen ist und zwar unabhängig vom Lebensalter (KISHIMOTO et al. 1987). Die Gesamtinzidenz der Myokardbeteiligung bei viralen Erkrankungen wird auf 2% bis 5% geschätzt (KEREIAKES, PARMLEY 1984). Abweichende Zahlen ergeben sich durch die unterschiedliche Intensität der Symptomausprägung mit häufig klinisch inapparentem Verlauf, sowie durch unterschiedliche pathologisch-anatomische Kriterien bei der Begutachtung. Einheitliche Angaben finden sich bei der Alters- und Geschlechtsverteilung: Ein Maximum der Erkrankungshäufigkeit liegt im dritten Lebensjahrzehnt, das männliche Geschlecht ist mit 2/3 überrepräsentiert (REYES, LEORNER 1986).

Klinik und Verlauf der virusinduzierten Myokarditis

Probleme bei der Diagnosestellung entstehen durch den oft uncharakteristischen klinischen Verlauf der Virusmyokarditis, wodurch eine unbekannte Zahl von Fällen ganz der Statistik entgeht (KALTENBACH 1986). Neben gänzlich asymptomatischen Erkrankungen sind sowohl Verläufe mit unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, uncharakteristischen Thoraxschmerzen oder Fieber genauso beschrieben wie fulminante Verläufe mit akuter Herzinsuffizienz bis hin zum Sekundenherztod (KEREIAKES 1984, LEVI et al. 1988). Während die Sterblichkeit in der Säuglings- und Kleinkindphase teilweise bis 50% angegeben wird, sind Todesfälle beim Erwachsenen in der Akutphase eher selten und die Verläufe protrahierter und milder (SCHÖLLMERICH 1982, SCHULTE, SPRANGER 1985). Alle Verlaufsformen können in einer kompletten Remission, einer Defektheilung, einem plötzlichen Herztod oder einem chronischen Verlauf mit Cardiomyopathie (CMP) enden. Die in einer dilatativen CMP endenden Verläufe haben eine sehr schlechte Prognose und sind geprägt von zunehmender Insuffizienz vor allem des

1. Einleitung

linken Herzens mit Rückgang der Kontraktilität und der Ejektionsfraktion. Die Folgen sind Stauungslunge mit Dyspnoe, Oedeme, Nykturie bis hin zum cardialen Schock innerhalb weniger Jahre nach Diagnosestellung (GROSS, SCHÖLLMERICH 1982, KEREIAKES 1984, KISHIMOTO et al. 1985, SIEGENTHALER et al. 1987, LYDTIN, TERNKWALDER 1988, SCHULTHEISS 1989).

Entsprechende Befunde wie Insuffizienzerscheinungen und Rhythmusstörungen in der Akutphase sowie chronische Verläufe mit Cardiomyopathie lassen sich in identischer Weise auch bei den Versuchstieren erheben, sodaß eine Übertragbarkeit des verwendeten Tiermodells auf den Menschen möglich ist (LOHR, SLENCZKA 1987, MÜCK 1991)

Diagnose und histopathologische Befunde

Neben der klinischen Untersuchung stehen zwar laborchemische und virologisch-serologische Untersuchungsmöglichkeiten sowie apparative Methoden wie Echo- und Elektrokardiographie, Szintigraphie und Röntgen zur Diagnosefindung zur Verfügung, als beweisend ist jedoch nur die Endo-Myokardbiopsie mit histologischer Begutachtung anzusehen (OLSEN 1985, RICHARDSON 1985).

Durch Untersuchungen von MORIATO (1987) konnte eine ungefähre zeitliche Zuordnung der pathologisch-anatomischen Befunde zum Infektionsstadium vorgenommen werden. In der Frühphase überwiegen Myokardfasernekrosen, Hämorrhagien im subendokardialen und subepikardialen Bereich, je nach Schwere der Erkrankung fokal oder generalisiert. Vom neunten Tag an stehen Muskelfragmentation und Kalzifizierung nekrotischer Bezirke im Vordergrund. Ab dem vierzehnten Tag kann eine Proliferation von kollagenen Fasern sowie eine reaktive Myozytenhypertrophie bei abnehmenden Infiltraten nachgewiesen werden. Vom sechsundvierzigsten Tag an lassen sich keine Nekrosen sowie Infiltrate mehr erkennen, wohl aber eine starke Proliferation kollagener Fasern bei einer deutlichen Strukturanomalie der Muskelfaseranordnung, die durch fibrotische Bezirke auseinandergedrängt ist.

Ebenso wie bei der Symptomausprägung besteht auch hier eine enge Korrelation zu den bei den Versuchstieren erhobenen Befunden (LOHR; SLENCZKA 1987).

Therapie der Virusmyokarditis

Die derzeitigen therapeutischen Möglichkeiten der virusinduzierten Myokarditis sind leider als sehr unbefriedigend anzusehen, da lediglich eine symptomatische Therapie betrieben werden kann. Bettruhe und körperliche Schonung zielen darauf ab, den Verlauf der Erkrankung zu mildern und den Zustand des Patienten zu stabilisieren, ebenso wie eine medikamentöse Therapie der Komplikationen mit positiv inotropen Substanzen, Vasodilatoren, Diuretika oder Antiarrhythmika. Der Übergang in einen chronischen Verlauf mit

1. Einleitung

dilatativer CMP im Endstadium und lebensverlängernder Herztransplantation läßt sich hierdurch jedoch nicht verhindern (LYDTIN, TRENKWALDER 1988). Über den Krankheitsverlauf beeinflussende Faktoren sowie Therapieansätze wie Immunstimulation in der Frühphase oder Immunsuppression in der Spätphase der Erkrankung bestehen bisher unterschiedliche Auffassungen (DALY 1982, MÜCK 1991).

Grundlagen und Zielsetzung der Arbeit

Das Immunsystem basiert auf einem komplexen Zusammenwirken von Gleichgewichten und Kontrollmechanismen, die eine Regulation durch inhibierende und stimulierende Einflüsse erlauben. Beim Auftreten einer akuten Infektion kommt es zur Aktivierung von spezifischen und unspezifischen sowie zellulären und humoralen Abwehrreaktionen. Neben der zellvermittelten Immunität durch T-Lymphozyten wird auch die Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten als spezifisch oder adaptiert bezeichnet, da eine schnelle und gezielte Immunantwort durch Erkennen von gespeicherten Antigenkonfigurationen möglich ist. Phagozytose und Komplement-Aktivierung dagegen sind Bestandteil der unspezifischen Abwehrmechanismen, da hier kein antigenspezifischer Angriff erfolgt. Im Rahmen einer Immunantwort sind die Systeme nicht als isolierte Säulen anzusehen, sondern die volle Wirksamkeit des Immunsystems wird erst durch intensive Interaktionen der verschiedenen Komponenten erreicht (WIESMANN et al. 1986, GAUNTT 1988). Aufgrund des komplexen Aufbaus ist auf vielen Ebenen eine physiologische Beeinflussung, zum Beispiel durch Interleukine oder Thymushormone, sowie eine exogene Einflußnahme durch Immunstimulantien und Immunsuppressiva möglich.

Bereits Anfang dieses Jahrhunderts fand man eine Beeinflussung sowohl der spezifischen als auch der unspezifischen Immunantwort durch Cholesterin. DEWEY et al. beobachtete 1914 eine Herabsetzung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen durch Cholesterin und CHASSIN beschrieb 1934 eine verminderte Antikörperantwort bei Hasen unter induzierter Hypercholesterinämie. Trotz zahlreicher, weiterführenden Studien konnte der Einfluß von Cholesterin auf das Immunsystem noch nicht vollständig geklärt werden. Übersichten über die vielfältigen, teilweise kontrovers diskutierten Ergebnisse geben LORIA (1976), CAMPBELL (1979), KOS (1982), PERREIRA (1987) und BRAUNWALD (1991).

Schon 1972 wurde von BROWN eine Verlängerung der Überlebenszeit bei mit Influenzaviren infizierten Mäusen unter Isoprinosinetherapie durch Hemmung der Virusreplikation beschrieben. Auch ohne den Wirkmechanismus erklären zu können, war eine rationale Begründung für eine Testung bei verschiedenen Erkrankungen gegeben, da sich Isoprinosine aufgrund entsprechender in vivo und in vitro Untersuchungen als wirkungsvoller Stimulator des Immunsystems herausstellte. Im Laufe der Zeit konnte unter anderem eine Beeinflussung von Herpes simplex-Infektionen (GORDON 1974), Rhinovirus-Infektionen (PACHUTA 1974), akuten viralen Enzephalitiden (CHANG 1977, BUGÉ 1979), Influenza-Infektionen (BETTS 1978) und der subakut sklerosierenden Panencephalitis (JONES 1982) nachgewiesen werden. Auch konnte bei immunsupprimierten Patienten der Verlauf von Virusinfekten abgeschwächt werden (OCHOCKA 1984).

Zur Untersuchung der Einflüsse einer Hypercholesterinämie sowie einer Therapie mit Isoprinosine auf die initiale Immunantwort existieren zahlreiche Untersuchungen. Die an verschiedenen Tiermodellen und in individuellen Versuchsdurchführungen erhobenen, teilweise abweichenden Daten entbehren dadurch jedoch einer Vergleichsmöglichkeit. Ziel dieser Studie ist es, anhand von einheitlich erhobenen immunologischen

1. Einleitung

und virologischen Parametern im Verlauf der Akutphase einer Virusmyokarditis den immunsupprimierenden Einfluß von Cholesterin direkt dem immunstimulierenden Einfluß von Isoprinosine gegenüberzustellen. Auf diese Weise sollen die Unterschiede noch deutlicher hervorgehoben und die Grundlage für eine vergleichende Diskussion geschaffen werden. Durch Standardisierung der in vivo Studie sind in übertragender Weise auch Aussagen über die Frühphase der Virusmyokarditis beim Menschen möglich.

Aufbau der Studie

Sechs Wochen alte männliche NMRI-Mäuse werden mit dem Encephalomyokarditis-Virus infiziert. Von einer mit Isoprinosine therapierten Gruppe sowie einer mit cholesterinreicher Diät ernährten Gruppe und einer unbehandelten Kontrollgruppe werden während der Akutphase der Erkrankung der klinische Verlauf sowie am Tag zwölf der Erkrankung der histopathologische Befund des Myokards protokolliert. Weiterhin werden Interferon- und Antikörperproduktion sowie Virustiter in Milz und Myokard der einzelnen Versuchstiere untersucht.

Material und Methoden

1.

Material

1.

Geräte

- Cleanbench UVUB 1.200, Fa. Uniflow
- Einfach- und Mehrfachpipettierautomaten, Fa. Eppendorf
- Einmalglaskapillaren, steril
- Einmalkanülen, steril, Fa. Braun, Fa. Terumo
- Einmalspritzen, steril, Fa. Braun
- Elisa-Photometer
- Elisa-Processor, Fa. Organon Teknika
- Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Filterpapier, Fa. Schleicher
- Flachbodenmikrotiterplatten mit Deckel, Fa. Falcon, Fa. Nunc
- Gewebekulturflaschen, verschiedene Größen, Fa. Greiner
- Kühlraum, 4°C, Fa. Viessmann
- Kühlschrank, 4°C, Fa. Liebherr
- Kühltruhe, -20°C, Fa. Liebherr
- Kühltruhe, -80°C, UF 85 300S, Fa. Colara
- Magnetrührer Magnetic 80, Fa. Kniese
- Mikrowellenherd
- Mikroskop Axioplan mit Fluoreszenzeinheit, Fa. Zeiss

1. Einleitung

- Mikroskop Labovet, Fa. Leitz
- Plattenphotometer MR 700, Fa. Dynatech
- Präparationsbesteck, steril
- Rüttelpult 3018, Fa. GFL
- Rüttler Reax 2000, Fa. Heidolph
- Rundbodenmikrotiterplatten, Fa. Greiner, Fa. Nunc
- Spectrophotometer DU 40, Fa. Beckmann
- Ultraschallgerät Sonifier cell disruptor B 15, Fa. Branson
- Ultrazentrifuge L7-55, Fa. Beckmann
- Waage Excellence, Fa. Sartorius
- Waage Research, Fa. Sartorius
- Wärmeschrank Cytoperm, Fa. Heraeus
- Wasserbad Thermomix 1420, Fa. Braun
- Zellzählkammer, Fa. Neubauer
- Zentrifuge J6B, Fa. Beckmann

1.

Reagenzien

- Äther zur Narkose, Fa. Höchst
- Agarose, Fa. Merck
- Anti-mouse-IgG, Horseradish peroxidase linked whole antibody, Fa. Amersham
- Aqua bidest., Fa. Fresenius
- Dapi-Fluoreszenzfarbstoff
- E
etal calf serum (FCS), Fa. Gibco, inaktiviert bei 56 °C für 30 Min.
- Formaldehyd, 37%ig
- Glutamin (200 mM), hundertfach konzentriert, Fa. Gibco
- HCL, 10 N
- HEPES-Pufferlösung (1M), fünfzigfach konzentriert (=Hydroxyethylpiperazinsulfonsäure) Fa. Biochrom
- Interferonstandard IFN alpha (104 I.E./ml)
- Ipazyme-Pufferkonzentrat, zehnfach konzentriert, Fa. Savyon Diagnostics
- Kristallviolett-Stammlösung
Citronensäure 2,1 g
Na₃ 0,06 g
Kristallviolett 0,2 g
ad Aqua bidest. 100 ml
- M
inimal essential medium (MEM), zehnfach konzentriert (EAGLE 1959) mit 0,04% Phenolrot als Farbindikator
- Natriumbikarbonatlösung (NaHCO₃), 1,4%ig
- Natriumchlorid (NaCl) 0,9%ig, Fa. Fresenius
- Natriumhydroxid (NaOH), 10 N
- Nonessentielle Aminosäurelösung (AS), hundertfach konzentriert, Fa. Biochrom
- Nonessentielle Aminosäurelösung (AS), zehnfach konzentriert (LOCKHART et EAGLE 1959)
- Q

-Phenyl-giamin (OPD)

- PBS (phosphate buffered saline) ph 7,4, (DULBECCO 1954)
Natriumchlorid (NaCl) 8,00 g
Kaliumchlorid (KCl) 0,20 g
Kaliumdihydrogenphosphat 0,20 g
Dinatriumhydrogenphosphat 2,90 g
Natriumazid (Na₃) 0,20 g
ad Aqua bidest. 1.000 ml
- PBSdef.
- PBSmin. mit Ca⁺⁺ - und Mg⁺⁺ -Ionen
- Penicillin, Fa. Grünenthal

1. Einleitung

- Phenolrot 0,04%ig, Fa. Merck
- Protein-Assay, Fa. Bio Rad
- Rinderserumalbumin (BSA), Fa. Behring
- RPMI 1640
- Sodium Pyruvat (100 mM), Fa. Gibco
- Stickstoff, flüssig
- Streptomycinsulfat
PS-Lösung: 10,4 Mega I.E. Penicillin
10 g Streptomycinsulfat
ad Aqua bidest. 1.000 ml
- Trypsin 2,5%ig, Fa. Seromed
Trypsinierungslösung: Trypsin 0,005 % v/v
Versen 0,050 % v/v
PBS 100 % v/v
- Tween 20
- Versen 0,5%ig, Fa. Serra
- Vitalfarbstoff MTT, Fa. Sigma
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 3%ig, Fa. Merck

1.

Lösungen zur Zellkultivierung

- PS-Lösung (siehe oben)
- Trypsinierungslösung (siehe oben)
- Adsorptionsmedium (AM):
MEM 10% v/v
AS 10% v/v
NaHCO₃ 4% v/v
PS 1% v/v
ad Aqua bidest. 100% v/v
- Erhaltungsmedium (EM):
MEM 10% v/v
AS 10% v/v
NaHCO₃ 4% v/v
PS 1% v/v
FCS 1% v/v
ad Aqua bidest. 100% v/v
- Wachstumsmedium (WM) :
MEM 10% v/v
AS 10% v/v
NaHCO₃ 4% v/v
PS 1% v/v
FCS 5% v/v
ad Aqua bidest. 100% v/v

1.

Lösungen für den Interferonnachweis

- Adsorptionsmedium (AM):
AS100x 1% v/v
HEPES50x 1% v/v
Glutamin100x 1% v/v
So. Pyruvat 1% v/v
PS 1% v/v
ad RPMI 1640 100% v/v
- Erhaltungsmedium (EM) : wie AM
-

1. Einleitung

- Wachstumsmedium (WM) :
 - AS100x 1% v/v
 - HEPES50x 1% v/v
 - Glutamin100x 1% v/v
 - So. Pyruvat 1% v/v
 - PS 1% v/v
 - FCS 5% v/v
 - ad RPMI 1640 100% v/v

1.

Lösungen für den Plaquetest

- Lösungen für den Overlay
- Agaroselösung:
 - Agarose 0,8% v/v
 - ad Aqua bidest. 100 % v/v
- Nährlösung:
 - MEM 20 % v/v
 - AS 20 % v/v
 - NaHCO₃ 20 % v/v
 - PS 2 % v/v
 - FCS 5 % v/v
 - ad Aqua bidest. 100 % v/v
- Kristallviolett-Lösung zum Färben und Fixieren
 - Kristallviolettstammlösung 100 ml
 - Formaldehyd 37%ig 100 ml
 - Aqua bidest. 800 ml

1.

Lösungen für den ELISA

- Coating-Puffer:
 - Natriumkarbonat 1,59 g
 - Natriumbikarbonat 2,93 g
 - Natriumazid 0,20 g
 - ad Aqua bidest. 1.000 ml
- Waschpuffer PBS-Tween 1%ig:
 - Tween 20 10 ml
 - PBSdef. 1.000 ml
- Serumpuffer PBS-Tween 4%ig:
 - Tween 20 40 ml
 - PBSdef. 1.000 ml
- Rinderserumalbumin-Lösung zum Blocken 1%ig:
 - BSA 1,00 g
 - ad PBSdef. 100 ml
- OPD-Lösung:
 - Ipazyme-Pufferkonzentrat 10 ml
 - ad Aqua bidest. 90 ml
 - O-Phenyl-diamin 40 mg
 - Wasserstoffperoxid 40 µl

1.

Versuchstiere

1. Einleitung

Bei den verwendeten Mäusen handelt es sich um voll immunkompetente, sechs Wochen alte Tiere. Die ursprünglich von "Swiss Mäusen" stammenden Tiere wurden im US Naval Medical Research Institute (NMRI) jahrelang ingezüchtet. 1955 kamen Tiere dieses Stammes nach Tübingen an die Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten. Von dort erhielt das Zentralinstitut für Versuchstierzucht 1958 mehrere weibliche und männliche Mäuse des Stammes NMRI, der seitdem in Hannover (Han) als geschlossene Auszuchtkolonie (Han:NMRI) weitergeführt wird. Die Han:NMRI-Zucht ist seit 1966 von spezifiziert pathogenen Keimen frei (LÖRCHER 1990).

L-Zellen

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um L-Zellreihen aus murinem Bindegewebe. Sie stammen aus dem "Institut für Virologie" sowie aus dem "Institut für Immunologie der Philipps-Universität, Marburg", mit der Spezifikation: NCTC, Strain L, Clone 929, CCL 1 (SANFORD, EARLE, LIKELY 1948, PAUL 1970).

Verwendete Viren

0. EMC-Viren

Das Enzephalomyocarditis-Virus gehört zur Gruppe der Picorna-Viren und wurde von HELWIG und SCHMIDT 1945 erstmals isoliert. 1958 fand durch JUNGEBLUT eine Adaptation an L-Zellen statt. Neben der Myokarditis ruft das EMC-Virus bei Mäusen eine Enzephalitis sowie einen Diabetes mellitus hervor. Bei den verwendeten Viren handelt es sich um eine kardiotope Variante des EMC-Virus (EGGERS, Institut für Virologie, Universität Köln).

VS-Viren

Für den Interferontest wird das bovine Vesikular-Stomatitis-Virus (Indiana Strain) aus dem "Institut für Immunologie der Philipps-Universität, Marburg" benutzt.

Isoprinosine

Bei Isoprinosine (Inosiplex, Methisoprinol) handelt es sich um einen Komplex aus Inosin sowie einem Salz der p-Acetamidobenzoesäure (pAcBS) mit N-N-Dimethylamino-2-propanol in einem 1:3 molaren Verhältnis.

1. Einleitung

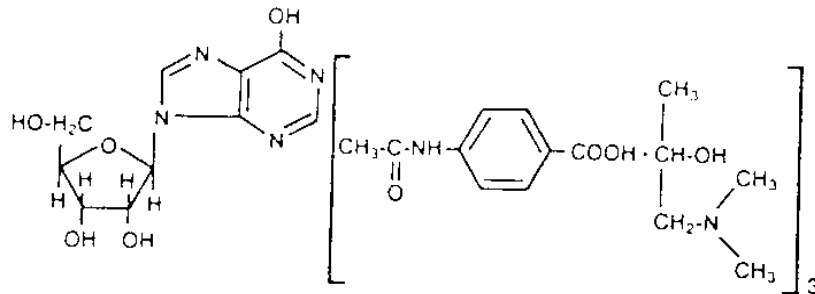


Abb. 1

: Strukturformel von Isoprinosine

0. Wirkmechanismus

Aufgrund der in zahlreichen in vivo und in vitro Studien gemachten Beobachtungen mit einem immer komplexeren Wirkspektrum der Substanz sind differenzierte Aussagen zur Wirkungsweise von Isoprinosine auf biochemischer Ebene nicht möglich (NAKAMURA 1983, HERSEY 1984, TSANG 1985).

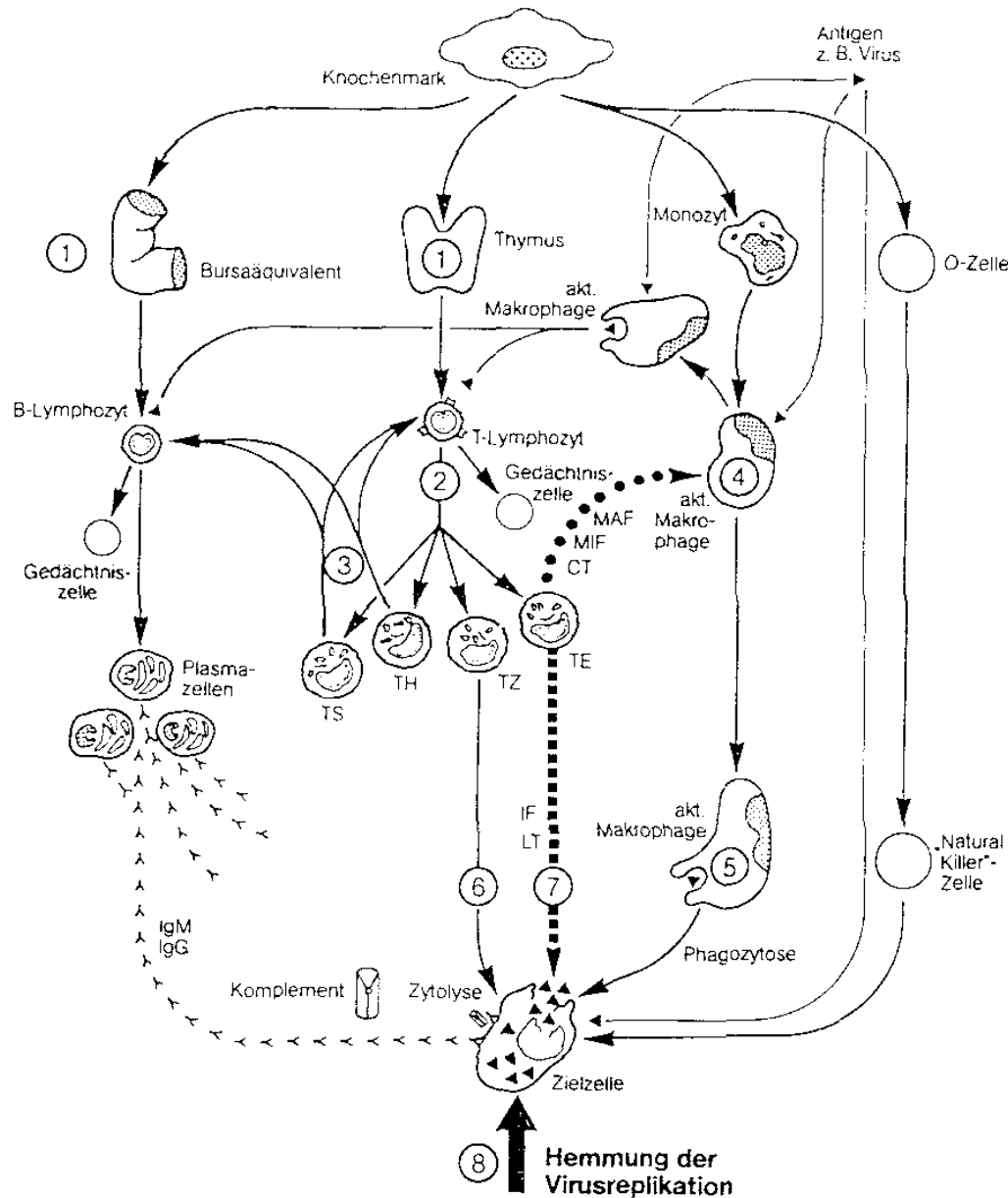
Zunächst wurde die Wirkung auf Lymphozyten untersucht, wobei Inosin, eine in allen tierischen und pflanzlichen Geweben vorkommende Substanz, eine besondere Rolle spielt. Da Lymphozyten stark vom sogenannten "salvage pathway", einem Stoffwechselweg, über den bereits fertig synthetisierte Purine in das Zellinnere gelangen und dort phosphoryliert werden, abhängig sind, steht Inosin als rasch verwertbarer Purinbaustein der RNS- und DNS-Synthese zur Verfügung (WYBRAN 1978). Die anderen Bestandteile der Verbindung erleichtern den Transport von Inosin in die Lymphozyten. Nach Inkubation von Lymphozyten mit dem Komplex fand man dreifach höhere intrazelluläre Konzentrationen von Inosin als nach Inkubation der Zellen mit einer äquimolaren Konzentration von Inosin alleine (HADDEN, LOPEZ 1977). 1982 wurde von MORIN und OHNISHI die Penetration von Isoprinosine in Lymphozyten als Komplex bestätigt.

Sicher ist, daß Isoprinosine keine Stimulierung der Lymphozyten per se hervorruft, sondern die antigeninduzierte Lymphozytenproliferation ebenso verstärkt, wie die RNS-Synthese in aktivierten Lymphozyten nach Triggerung durch Mitogene wie Phytohämagglutinin, Concanavalin A oder Pokeweed (GINSBERG, GLASKY 1977).

1. Einleitung

Weiterhin fand man bei Isoprinosine auch eine direkt antivirale Wirkung, die jedoch nicht der von klassischen Antimetaboliten entspricht (MÜLLER 1979, WYBRAN 1984). Die Substanz hat keinen Einfluß auf die virale Nukleinsäuresynthese oder auf Nukleinsäurepolymerasen sondern verursacht über Bindung an Ribosomen eine sterische Modifikation, wodurch Polyribosomen-RNA-Komplexe stabilisiert und der nukleozytenplasmatische Transport zellulärer m-RNA erhöht wird. Durch diese Wirkung auf den polyribosomalen Translationsprozeß wird die Translation exogener, das heißt viraler Nachricht gehemmt und die Verarbeitung endogener RNA gefördert (DE SIMONE 1985). Doch auch hiermit ist die antivirale Wirksamkeit von Isoprinosine nicht ausreichend zu erklären. Eine Übersicht über die vielschichtigen Angriffspunkte der Substanz, die zur Hemmung der Virusreplikation führen, gibt die folgende Abbildung.

1. Einleitung



- 1: Reifungsförderung der B- und T-lymphozyten
- 2: Stimulation der T-Lymphozyten-Proliferation
- 3: Stimulation der Aktivität von TH- und TS-Zellen
- 4: Stimulatin der Makrophagen-Aktivierung
- 5: Erhöhung der Phagozytose-Aktivität
- 6: Aktivitätssteigerung der zytotoxischen T-Lymphozyten
- 7: Stimulation der Sekretion und Wirkung von LT und IF
- 8: Hemmung der Virusreplikation

1. Einleitung

8: Hemmung der Virusreplikation

Abb. 2:

Übersicht der Angriffspunkte von Isoprinosine

(aus Produktinformation für Fachkreise, FISIONS 1993)

CT: chemotaktischer Faktor, MAF: Makrophagen aktivierender

Faktor, MIF: Makrophagen inhibierender Faktor,

LT: Lymphotoxin, IF: Interferon, TH: T-Helfer-Lymphozyt,

TS: T-Suppressor-Lymphozyt, TZ: zytotoxischer-T-Lymphozyt

TE: T-Effektor-Lymphozyt

Für die Steigerung der Interferon-, Interleukin- oder der Antikörperproduktion sowie die Stimulierung der Aktivierung der Makrophagen, die Steigerung der Zytotoxizität von Lymphozyten gegen virusinfizierte Zellen als auch die vermehrte Ansprechbarkeit von Zellen auf Interferon unter Isoprinosinebehandlung lassen sich keine definitiven Erklärungen geben. In neueren Untersuchungen fiel eine große Zahl von Übereinstimmungen in der Wirkungsweise mit Produkten von Immunzellen auf. Besonders mit den Thymushormonen Thymopoietin, Thymosin alpha 1 und Thymolin scheint eine enge Verwandtschaft in der Wirkungsweise zu bestehen, sodaß Isoprinosine als "Thymomimetische Droge " bezeichnet wurde (HADDEN 1991).

Pharmakokinetik und Nebenwirkungen

Isoprinosine ist oral und intravenös applizierbar. Es wird sehr schnell metabolisiert, die Halbwertszeit des Inosinanteils beträgt nach oraler Gabe 50 Minuten und nur 3 Minuten nach intravenöser Anwendung. 90% des Inosins werden bei Versuchstieren als Allantoin, beim Menschen als Harnsäure ausgeschieden. Der restliche Anteil erscheint als Hypoxanthin und Adenin. Die anderen Bestandteile des Komplexes werden oxidiert und glukuronisiert und mit dem Urin ausgeschieden (GINSBERG 1977, NIELSEN 1981).

Isoprinosine gilt praktisch als untoxisch. Die LD50 liegt im Tierversuch zwischen 5 g/kg und 10 g/kg Körpergewicht (ELLIOT, OKUN 1972). In klinischen Studien wurde neben gelegentlicher Übelkeit nur eine zeitweilige Erhöhung der Harnsäure im Blut und Urin festgestellt. Als relative Kontraindikation ist deshalb nur die Hyperurikämie anzusehen (GINSBERG 1974).

Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten wurden nicht beobachtet. Eine verständliche Ausnahme bilden systemisch angewandte starke Immunsuppressiva, die die immunstimulierende Wirkung von Isoprinosine abschwächen.

1. Einleitung

Eine Zulassung besteht in Deutschland derzeit für folgende Anwendungsgebiete: Herpes simplex-Infektionen, subakut sklerosierende Panencephalitis, akute virale Encephalitiden ausgelöst durch Herpes simplex-, Epstein Barr- und Masernviren sowie immunsupprimierte Patienten mit Virusinfekten durch Herpes simplex-, Varicella zoster-, Masern-, Zytomegalie- und Epstein Barr-Viren (FISONS 1995).

1.

Methoden

0.

Einteilung und Kennzeichnung der Versuchstiere

Die Tiere werden zufällig in eine der Versuchsgruppen eingeteilt und mittels nummerierter Ohrmarken gekennzeichnet. Auf diese Weise sind die Tiere jederzeit zu identifizieren und später erhobene Parameter lassen sich den bestimmten Tieren zuordnen.

Tierhaltung

Die NMRI-Mäuse werden in Käfigen zu je zehn Tieren gehalten. Nicht infizierte und infizierte Versuchstiere werden strikt voneinander getrennt. Bei mehrmaliger täglicher Inspektion wird auf strenge Hygiene geachtet, tote Tiere werden sofort entfernt.

Füttern und Therapieren der Versuchstiere

0.

Kontrollgruppen

Alle nicht infizierten und alle infizierten, nicht therapierten Tiere erhalten ein Standardfutter.

Mit Isoprinosine therapierte Tiere

Die Tiere dieser Gruppen erhalten ab Tag 1 post infectionem (p.i.) ein mit Isoprinosine angereichertes Futter, so daß die tägliche Aufnahme von Isoprinosine 250 mg/kg Körpergewicht entspricht.

1. Einleitung

Cholesterinreich gefütterte Tiere

Die mit cholesterinreicher Spezialdiät gefütterten Tiere erhalten diese ab zwei Tage vor Infektion.

Vorversuche

Zum Ausschluß eines Einflusses der verschiedenen Futtersorten auf den Gewichtsverlauf werden je zehn Tiere über zwölf Tage mit den oben genannten Futtersorten ernährt. Der Gewichtsverlauf wird protokolliert und am zwölften Tag der Blutcholesterinspiegel bestimmt.

Infizieren der Tiere

Die zu infizierenden Tiere erhalten 0,1 ml einer EMC-Virusverdünnung mit 100 plaque forming units (pfu) intraperitoneal (i.p.) injiziert (entsprechend 1000 pfu pro ml). Der nicht infizierten Kontrollgruppe werden 0,1 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung i.p. gespritzt, um eine adäquate Streßreaktion bei diesen Tieren zu erzeugen.

Protokollieren des Versuchsverlaufs

Es findet eine tägliche Gewichtskontrolle sowie eine Feststellung des Krankheitsverlaufs bei den einzelnen Versuchstieren statt. Protokolliert werden neben Gewichtsverlauf und Lähmungserscheinungen auch die Sterberaten in den einzelnen Versuchsgruppen.

Histopathologische Begutachtung

Der Krankheitsverlauf von je fünfzehn infizierten Tieren einer infizierten, nicht therapierten Gruppe, einer mit cholesterinreicher Diät gefütterten Gruppe sowie einer mit Isoprinosine therapierten Gruppe wird wie oben beschrieben protokolliert. Am Tag 12 p.i. werden die Herzen der noch lebenden Tiere entnommen. Als Kontrolle werden jeweils die Herzen von sechs nicht infizierten Tieren aus einer nicht behandelten, einer mit cholesterinreicher Diät gefütterten und einer mit Isoprinosine behandelten Gruppe entnommen.

0.

Organentnahme

1. Einleitung

Nach Töten der Versuchstiere durch cervikale Dislokation werden Thorax und Abdomen eröffnet und das Herz entnommen. Anschließend werden Blutreste durch Spülung in 4%iger Formaldehydlösung entfernt und die Organe in einem Einmalreagenzglas in 4 ml der selben Lösung aufbewahrt.

Organaufbereitung

Nach Asservieren der Herzen werden subvalvuläre Paraffinschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (ROMEIS 1984).

Begutachtung

Die Schnitte werden lichtmikroskopisch hinsichtlich Myokarditis, lymphozytären Infiltraten, Nekrosen und Kalzifizierungen untersucht und das Ergebnis protokolliert.

Serumgewinnung

Unter Äthernarkose wird durch den medialen Lidwinkel eine sterile Glaskapillare in das retrobulbäre Venengeflecht eingebracht. Nach Entnahme von ca. 1 ml Blut werden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet. Das gewonnene Blut wird zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, in Ampullen gefüllt und bei -20° C gelagert.

Sterile Organentnahme für den Plaquetest

Die Tiere werden wie bereits beschrieben getötet. Nach ventraler Abpräparation des Felles wird aus Sterilitätsgründen das Besteck gewechselt. Nach Eröffnung von Thorax und Abdomen werden Herz und Milz präpariert und entnommen. Anschließend werden Blutreste sorgfältig mittels Spülung der Organe in PBSmin entfernt, die Organe in einem Mörser unter Zugabe von sterilem Sand zerkleinert und in 1 ml PBSmin aufgenommen. Ein weiteres Aufschließen der Proben findet durch Ultraschall statt und nach Zentrifugation (15 min., 3000x) werden die Überstände abpipettiert und ampulliert. Die bis dahin bei 4° C gehaltenen Proben werden in flüssigem Stickstoff bei etwa -190° C schockgefrostet und bei -80° C gelagert.

Kultivieren von Zellreihen

1. Einleitung

0. Zellhaltung

Die adhärent wachsenden L-Zellen werden in Gewebekulturflaschen (Fa. Greiner) im Wärmeschrank bei 37° C inkubiert. Das Wachstum wird täglich lichtmikroskopisch kontrolliert, alle zwei Tage wird das Medium gewechselt, bei bodenbedeckendem Wachstum wird von Wachstumsmedium (WM) auf Erhaltungsmedium (EM) gewechselt.

Umsetzen von Zellen

Zur Zellvermehrung und um ein Überwachsen der Zellen in den Kulturflächen zu vermeiden, werden die Zellen regelmäßig umgesetzt und je nach Bedarf verdünnt ausgesät.

Nach Dekantieren des Mediums werden die Zellen zweimal mit je 10 ml PBSdef gewaschen. Ein Ablösen der Zellen wird durch Zugabe von Trypsinierungslösung (ca. 1,5 ml pro 100 cm²) erreicht. Alle Zellen werden durch leichtes Schwenken gleichmäßig benetzt und die restliche Trypsinierungslösung danach abpipettiert. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der vollständigen Ablösung werden die Zellen in 9 ml Adsorptionsmedium (AM) aufgenommen und kurz gerüttelt, um Adhäsionen zu vermeiden. Im Anschluß wird die Zellzahl bestimmt und die Suspension auf neue Kulturflaschen verteilt. Nach Zugabe von WM (80 ml je 500 ml-Kulturflasche) werden die Kulturflaschen bei 37° C im Wärmeschrank inkubiert.

Zellzahlbestimmung

Die durch Trypsinierung gewonnene Suspension wird je nach Zelldichte auf 1:10 bis 1:100 verdünnt und in die NEUBAUER-Kammer eingefüllt. Durch Auszählen von vier Großquadraten, die jeweils in sechzehn kleinere Quadrate unterteilt sind, und Bilden des arithmetischen Mittels ergibt sich die Zellzahl pro 0,1 µl vorverdünnter Suspension. Durch entsprechende Umrechnung läßt sich die Zellzahl pro ml Ausgangssuspension angeben (SANDFORD et al. 1951).

Sterilitätsprüfungen

Alle Lösungen und Medien werden regelmäßig bei 37° C mit Sabouraud-, Dextran- und Blutagar sowie Thioglykolatmedium auf Sterilität überprüft. Eine Mykoplasmeninfektion der Zellreihen wird durch regelmäßige Durchführung eines Dapi-Nachweises ausgeschlossen.

1. Einleitung

Mykoplasmenachweis

Als Dapi bezeichnet man einen Fluoreszenzfarbstoff (4-6-Diamino-2-phenylindol-di-hydrochlorid), der selektiv an adenin-thymin-reiche DNS bindet. Das Absorptionsmaximum liegt bei 340 nm, das Emissionsmaximum bei 488 nm. Durch Bildung von fluoreszierenden DNS-Dapi-Komplexen hoher Spezifität lassen sich Mykoplasmen zuverlässig nachweisen.

5 µg des kristallinen Dapi werden in 1 ml Aqua bidest. gelöst. Diese Stammlösung wird zu 0,2 ml-Portionen bei -20° C gelagert. Vor Testung einer Zellkultur werden 0,2 ml Stammlösung mit 10 ml Methanol verdünnt. Die betreffende Zellkultur wird zweimal mit PBSdef gewaschen und für zehn Minuten mit der Dapi-Lösung bei 37° C inkubiert. Danach wird die Färbelösung entfernt, die Zellkultur mit Methanol gewaschen und mittels Ölimmersionsobjektiv (100x) fluoreszenzmikroskopisch (Axioplan, Fa. Leitz) untersucht. Eine eventuelle Mykoplasmenkontamination sticht als gelb-grün fluoreszierender Bezirk hervor.

Interferonbestimmung

Der verwendete Test auf Interferon wurde 1981 von EPSTEIN eingeführt. Er dient zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Interferon und beruht auf dessen zytoprotektivem Effekt von Zellkulturen gegenüber VS-Viren. Das Ausmaß der Zellyse dient hierbei als Parameter, um über erstellte Eichreihen mit bekannter Interferonkonzentration Rückschlüsse auf die Interferonkonzentration der Testseren ziehen zu können. Eine qualitative Auswertung der Zellyse ist bei Fixation und Färbung mit Kristallviolett-Lösung visuell möglich. Zur quantitativen Bestimmung ist eine Vitalfärbung mit MTT und photometrische Auswertung nötig (EPSTEIN et al. 1981).

0.

Vorversuche zur Interferonbestimmung

0. Ausschluß falscher Meßergebnisse durch bakterielle Kontamination

Vor jeder Versuchsreihe werden Sterilitätsprüfungen (vgl. 2.2.9.4. und 2.2.9.5.) durchgeführt, da eine bakterielle Kontamination der Zellreihen bei der photometrischen Auswertung der MTT-Vitalfärbung zu verfälschten Interferontitern.

1. Ausgleich des Einflusses der Mäuseseren auf das Zellwachstum

1. Einleitung

Bei Untersuchung des Einflusses der Mäuseseren auf die Zellkulturen fällt ein vermehrtes Wachstum im Vergleich zu den nicht mit Mäuseserum behandelten Zellen auf. Um keine falschen Meßergebnisse durch stärkeres Zellwachstum während der Inkubation zu erhalten, ist ein Ausgleich dieses Effektes nötig.

Der Wachstumseffekt von 1%igem und 0,1%igem murinem Serum wird mit dem Einfluß von fetalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS) in verschiedenen Konzentrationen bezüglich L-Zellen verglichen. Einem systematischen Fehler durch unterschiedliches Zellwachstum wird so vorgebeugt.

2. Ausschluß eines Einflusses von UV-Bestrahlung auf die Interferonaktivität

Zum Ausschluß einer verminderten Interferonaktivität nach UV-Bestrahlung der Mäuseseren werden zwei Eichreihen des verwendeten murinen Eichinterferons in Konzentrationen von 10^3 bis 10^{-4} I.E. pro ml hergestellt und eine für zehn Minuten, entsprechend der Testseren, mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend werden die Interferonaktivitäten der beiden Reihen verglichen.

3. Ausschluß eines Einflusses von Isoprinosine und Cholesterin auf die Interferonproduktion

Seren nicht infizierter, mit Isoprinosine behandelter Mäuse sowie mit cholesterinreicher Diät gefütterter Tiere werden mit Seren gesunder, un behandelter Tiere auf deren Interferongehalt untersucht.

Anlage der Zellkulturen für den Interferonnachweis

Für die Interferonbestimmung werden Flachbodenmikrotiterplatten mit Deckel (Fa. Nunc) verwendet. Die Beschickung und Beschriftung der 96 Cups geschieht wie folgt:

1. Einleitung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	S	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	VK	ZK	S
C	S	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	VK	ZK	S
D	S	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	VK	ZK	S
E	S	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	VK	ZK	S
F	S	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	VK	ZK	S
G	S	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	VK	ZK	S
H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

P1-8 : Serumproben
 VK : Viruskontrolle
 ZK : Zellkontrolle
 S : Verdunstungsschutz (100 µl PBS)

Abb. 3

: Beschickung der Mikrotiterplatten für den Interferonnachweis

Die randständigen 36 Cups werden mit je 100 µl PBS gefüllt, um einer Verdunstung und somit Fehlmessung durch Volumendifferenzen vorzubeugen. Die inneren 60 Cups werden zur Bestimmung von acht Proben sowie einer Zell- und Viruskontrolle jeweils durch 6fach-Messung verwendet.

Hierfür werden diese Cups mit je 30.000 L-Zellen in 200 µl RPMI-Wachstumsmedium gefüllt und für vier Stunden bei 37° C inkubiert. Eine genaue Bestimmung der Zellzahl (vergleiche 2.2.9.3.) sowie gleichmäßiges Verteilen der Zellen stellt die Basis für die Richtigkeit der gemessenen Interferonkonzentration dar, da dies über Anfärben von vitalen Zellen erfolgt und somit in entscheidendem Maße von der in die Cups gegebenen Ausgangszellzahl abhängt.

Um eine vorzeitige Adhäsion sowie das Bilden von Zellaggregaten zu vermeiden, wird die Suspension in Eiswasser gekühlt und bis zum Ende der Verteilung gerüttelt. Nach kurzer Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgt eine lichtmikroskopische Kontrolle auf Gleichmäßigkeit und Adhärenz des Zellrasens in den Cups.

Vorbereiten und Verteilen der Proben

Die zu untersuchenden Serumproben werden im Wasserbad (37° C) aufgetaut und zehn Minuten mit UV-Licht bestrahlt, um eventuell enthaltene, die Messung beeinflussende infektiöse Einheiten zu inaktivieren.

1. Einleitung

Anschließend werden die Proben mit RPMI-Adsorptionsmedium auf 10^{-2} verdünnt. Das WM in den Cups wird unter der Cleanbench (Fa. Uniflow) mit Hilfe einer Vakuumsaugglocke über eine dünne Einmalkanüle abgesaugt. Hierbei ist streng darauf zu achten, daß keine Kontamination der Cups sowie ein Absaugen von Zellen erfolgt, da beides das Meßergebnis beeinflussen würde.

Wie in Abbildung 3 gezeigt, erfolgt die Verteilung von jeweils 100 µl der vorbereiteten Proben in die Cups der Mikrotiterplatten. Die Zell- und Viruskontrollen werden mit jeweils 100 µl AM mit 6%igem FCS-Zusatz beschickt. Nach Abdecken der Platten erfolgt eine 18stündige Inkubation bei 37° C.

Pipettieren des VS-Virus

Nach erneutem Absaugen der Cups (vergleiche 2.2.10.3) werden 15.000 pfu VS-Virus in 100 µl AM auf die Proben sowie auf die Viruskontrolle gegeben. Die Zellkontrollen werden mit 100 µl AM ohne VS-Virus bedeckt.

Während erneuter Inkubation bei 37° C für 20 Stunden bildet sich der erwünschte cytopathische Effekt (CPE) in Abhängigkeit von der Interferonkonzentration aus. Gegen Ende der Inkubationszeit wird eine stündliche lichtmikroskopische Kontrolle der Platten durchgeführt, um bei ca. 75% CPE der Viruskontrolle, bezogen auf die Zellkontrolle, die MTT-Vitalfärbung durchzuführen.

Die MTT-Vitalfärbung

0. Der MTT-Farbstoff

Bei MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) handelt es sich um ein gelbes Salz, welches mittels mitochondrialer Dehydrogenasen in einen stark blauen, kristallinen, wasserunlöslichen Farbstoff umgewandelt wird. Hierbei besteht ein linearer Zusammenhang zwischen umgewandeltem Farbstoff und mitochondrialer Aktivität und somit auch zur Vitalität der Zellen (MOSMANN 1983).

1. Messen des entstandenen blauen Farbstoffs

Die wasserunlöslichen, blauen Kristalle können in Isopropanol gelöst werden. Anschließend wird die Intensität der Blaufärbung photometrisch bei 570 nm bestimmt (HERRMANN et al. 1960).

1. Einleitung

2. Vitalfärben der Proben

In jedes Cup werden 10 µl Farbstofflösung gegeben und für eine weitere Stunde bei 37° C inkubiert. Während dieser Zeit findet die Umwandlung des gelben Salzes in die blaue, kristalline Form statt.

Um die spätere photometrische Messung nicht durch Trübung zu beeinflussen, wird das Gemisch aus MTT-Lösung und AM abgesaugt und 100 µl einer Stopplösung in die Cups gegeben. Diese besteht aus einem 0,04 N HCl-Isopropanol-Gemisch und dient zum Abbrechen der enzymatischen Farbstoffumwandlung durch Devitalisierung der Zellen sowie zum Lösen der blauen Farbstoffkristalle.

Photometrische Messung

Die äußeren, mit PBS gefüllten, Cups werden abgesaugt und mit 100 µl HCl-Isopropanol-Gemisch beschickt. Sie dienen zur Bestimmung des Reagenzienleerwertes. Bei 570 nm wird die Extinktion der Cups in einem Plattenphotometer (Fa. Dynatech) gegen den Reagenzienleerwert bestimmt.

Bestimmung der Interferontiter

0. Erstellen der Eichkurve

Identisch zu den Serumproben wird der CPE bei bekannten murinen Interferonkonzentrationen von 10⁻² bis 10² I.E. pro ml bestimmt. Über die photometrisch gemessene optische Dichte (OD) wird durch folgende Formel:

$$\frac{\text{OD Probe} - \text{OD Viruskontrolle}}{\text{OD Zellkontrolle} - \text{OD Viruskontrolle}} \times 100 = \text{Vitalität (\%)}$$

die prozentuale Vitalität der Probe, bezogen auf die jeweilige Zellkontrolle, ermittelt, und diese gegen die bekannte Interferonkonzentration auf halblogarithmisches Millimeterpapier aufgetragen.

- Auswertung der Proben

1. Einleitung

Von jeder 6fach-Messung der Proben wird das arithmetische Mittel gebildet und über die o.g. Formel die prozentuale Vitalität bestimmt. Anhand der erstellten Eichkurve kann nun den Seren eine Interferonkonzentration zugeordnet werden.

Bestimmung der Viruskonzentrationen im Myokard und im Milzgewebe

Die Bestimmung der Viruskonzentrationen im Myokard und im Milzgewebe erfolgt mittels Monolayer-Plaquetest, welcher auf grundlegende Arbeiten von DULBECCO (1952) sowie von COOPER (1967) und NUZZOLO, VELLUCCI (1983) zurückgeht.

Das Testprinzip beruht auf der Erzeugung eines punktuellen CPE durch Virusvermehrung in einem mit Agarose bedeckten Zellrasen. Die Läsionen (Plaques) entstehen durch radiäre Ausbreitung einer Infektion über Zell-Zell-Kontakte oder durch Diffusion der Viren, ausgehend von einer infizierten Zelle. Hierbei wird jeder entstandene Plaque einer infektiösen Einheit (plaque forming unit, pfu), entsprechend einem Viruspartikel, gleichgesetzt.

0.

Vorbereiten der Monolayer

Für den Test werden sterile Zellkulturplatten mit Deckel (Fa. Lux Scientific Corp.) verwendet, die jeweils acht Cups der Größe 26 x 34 mm besitzen. Auf diese Weise kann pro Platte eine Probe in vier Verdünnungsstufen doppelt ausgetestet werden.

Die Zellen werden wie bereits beschrieben aus den Kulturflaschen gelöst und eine Suspension von 100.000 Zellen pro ml in WM hergestellt (vergleiche 2.2.9.2., 2.2.9.3.). Pro Cup werden 2 ml (entsprechend 200.000 Zellen) der Zellsuspension pipettiert, die Platten abgedeckt und zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen für fünf Minuten auf das Rüttelpult gegeben. Anschließend findet eine Inkubation für 24 Stunden bei 37° C statt, so daß sich ein Monolayer in den Cups ausbilden kann. Vor weiteren Arbeitsschritten erfolgt eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellrasen auf gleichmäßige und dichte Ausbildung.

Vorbereiten der Proben

Die bei -80° C gelagerten Herz- und Milzasservate werden aufgetaut und unter ständiger Kühlung bei 4° C gehalten. Es werden Verdünnungsreihen der Myokardproben von 100 bis 10⁻⁴ und der Milzproben von 100 bis 10⁻³ in PBSmin erstellt, wobei die Probenstammlösung als 100 gesetzt wird. Hierzu werden in 450 µl PBSmin jeweils 50 µl der vorherigen Verdünnungsstufe gegeben.

1. Einleitung

Beschicken der Monolayer mit den Proben

Mittels steriler Einmalkanüle und Vakuumsaugglocke wird das WM vorsichtig unter der Cleanbench abgesaugt und 500 µl PBSmin auf die Zellkulturen gegeben. Um Artefakte auszuschließen, werden die Platten nochmals lichtmikroskopisch auf Homogenität des Monolayers überprüft. Nun werden 55,6 µl der Proben in den verschiedenen Verdünnungsstufen auf jeweils ein Cup gegeben.

Durch die Vorgabe von 500 µl PBSmin in die Cups findet eine weitere Verdünnung von 1:10 statt, so daß die Milzasservate letztlich in den Konzentrationen von 10^{-1} bis 10^{-4} und die Herzasservate von 10^{-1} bis 10^{-5} ausgetestet werden, bezogen auf die Ausgangskonzentration. Die abgedeckten Platten werden für 15 Minuten auf dem Rüttelpult langsam geschwenkt (50x) und danach für weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Overlay

0. Vorbereiten des Overlays

Während die Nährlösung (2.1.5.1.1.) im Wasserbad auf 42° C erwärmt wird, wird die Agaroselösung (2.1.5.1.2.) zum Lösen der Agarose kurz aufgekocht und anschließend wieder auf 42° C abgekühlt. Nach Erreichen dieser Temperatur werden die Lösungen im Verhältnis 1+1 gemischt und weiter auf 42° C gehalten. Bei dieser Temperatur muß die Lösung innerhalb einer Stunde verarbeitet werden.

1. Pipettieren des Overlays

Nach der Inkubation werden die Proben von den Platten abgesaugt. Hierzu werden mittels steriler Einmalkanüle die Platten von der niedrigsten Probenkonzentration zur höheren Probenkonzentration hin abgesaugt. Bei jeder Probe wird eine neue Kanüle benutzt, um eine Virusübertragung zu vermeiden. Es wird erneut streng darauf geachtet, daß der Zellrasen beim Absaugen nicht beschädigt wird.

Auch beim sofortigen Bedecken der Zellen durch 2 ml des 42° C warmen Overlays wird vorsichtig pipettiert, um keine Artefakte zu produzieren. Bis zum vollständigen Aushärten des Overlays werden die Platten nicht mehr bewegt und im Anschluß für 48 Stunden bei 37° C inkubiert. Bei der weiteren Handhabung der Platten müssen größere Erschütterungen vermieden werden, da eine Verschiebung des Overlays eventuell eine Nichtauswertbarkeit des Cups durch Konfluieren der Plaques zur Folge haben könnte.

1. Einleitung

Kontrollansätze

Parallel zu den Proben werden Doppelbestimmungen der EMC-Stammlösung in den Konzentrationen von 10^{-1} bis 10^{-8} in gleicher Weise durchgeführt. Eine Platte ohne Antigenzugabe dient dazu, einen CPE durch Superinfektion auszuschließen.

Kontrolle und Färben der Platten

Es wird eine regelmäßige lichtmikroskopische Kontrolle des CPE durchgeführt und zum optimalen Zeitpunkt die Fixation und Färbung der Monolayer durchgeführt. Dies erfolgt durch Zugabe von je 0,5 ml Kristallviolettlösung und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei Raumtemperatur. Nach vorsichtigem Ausschlagen des Overlays werden die Platten gesäubert und getrocknet. Die Plaques imponieren jetzt als ca. 1 bis 2 mm große, runde, scharf begrenzte Aussparungen bei sonst blaugefärbtem Plattenboden.

Auszählung und Auswertung

Die beiden Cups der niedrigsten Verdünnungsstufe werden ausgezählt, bei der es zu keiner Konfluenz der Plaques gekommen ist. Die Platten werden hierzu auf ein weißes Blatt Papier gelegt, da sich die Plaques dadurch gegenüber dem blauen Plattenboden gut abheben und mit bloßem Auge auszählen lassen. Um eine Doppelzählung zu vermeiden, werden die Plaques mit einem wasserfesten Stift markiert. Die so erhaltenen Werte werden in folgende, von LORENZ 1961 entwickelte Formel eingesetzt und so die Anzahl infektiöser Einheiten pro ml Probe berechnet.

1. Einleitung

$$N_0 = \frac{K \times L_r}{t \times v} \times n_0$$

K : Verdünnungsstufe der ausgezählten Cups

(z.B. bei 10^{-2} : K = 100)

L_r : Verdünnungskonstante

(bei 1 : 10 Verdünnung : L_r = 1,0)

t : Anzahl der ausgezählten Cups pro Probe

v : Volumen in dem die Virussuspension auf dem
Monolayer inkubiert (hier: 0,5565 ml)

n₀ : Anzahl der ausgezählten Plaques

N₀ : Anzahl der in der Probe enthaltenen pfu pro ml

Die errechneten pfu-Werte werden halblogarithmisch (log 10) gegen die Zeit aufgetragen.

ELISA zum Antikörpernachweis

Die Antikörperantwort der mit EMC-Viren infizierten Tiere wird mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) untersucht. Diese Methode, die inzwischen zur immunologischen Routinediagnostik gehört, wurde vor gut zwanzig Jahren in Ergänzung zum RIA und FIA entwickelt.

Das Testprinzip des ELISA basiert auf der Bindung eines Antikörpers oder Antigens an ein Enzym, ohne dessen Aktivität zu verändern. In einem zweiten Schritt wird dieser Komplex über einen an eine Mikrotiterplatte gebundenen Immunpartner fixiert und im Anschluß die enzymatische Aktivität ermittelt. Hierüber ist ein Rückschluß auf die in der Probe vorhandene Menge an Antikörpern oder Antigenen möglich (ENGVAL, PERLMANN 1971, 1977).

0.

Antigenherstellung zum Coaten der Platten

0. Antigenvermehrung

1. Einleitung

Die Antigenvermehrung wird in fünf dicht mit L-Zellen bewachsenen Gewebekulturflaschen vorgenommen. Nach vorsichtigem Dekantieren der Flaschen werden in jede 2,5 ml einer EMC-Virusverdünnung (10.000 pfu pro ml) gegeben und nach gleichmäßigem Verteilen durch Schwenken der Flaschen diese für rund 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden 25 ml EM zugegeben und die Flaschen bei 37° C bis zum Auftreten eines 100%igen CPE in den Wärmeschrank gegeben. Der vollständige CPE wird lichtmikroskopisch nach 48 bis 72 Stunden festgestellt.

1. Antigenkonzentration

Der Überstand in den Flaschen wird vorsichtig abpipettiert und durch niedertourige Zentrifugation (15 min., 3.000x, 4° C) von enthaltenen Zellresten bereitet. Anschließend wird die Antigenkonzentration mittels Ultrazentrifugation (4 h, 19.000x, 4° C) durchgeführt und das so entstandene Sediment in 3 ml PBS aufgenommen.

2. Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt des konzentrierten Antigens wird mittels "Protein-Assay" (Fa. Bio Rad) durchgeführt. 25 ml der Bio Rad-Farblösung werden mit 75 ml Aqua bidest. verdünnt und anschließend durch einen Faltenfilter filtriert. In sieben Reagenzgläser werden jeweils 0,1 ml physiologische NaCl-Lösung pipettiert und dem ersten 0,1 ml des Proteinstandards zugesetzt. Nach Durchmischen werden dem ersten Reagenzglas 0,1 ml entnommen und in das zweite gegeben. Bei Fortführung entsteht auf diese Weise eine 1:2 Verdünnungsreihe über sechs Stufen. In gleicher Weise wird mit den zu untersuchenden Proben verfahren.

Nun werden jedem Reagenzglas 5 ml der filtrierten Farblösung zugesetzt, worauf eine Blaufärbung eintritt. Über die gemessene Extinktion des Proteinstandards gegen den Reagenzienleerwert (595 nm, 1 cm Quarzküvette) wird eine Eichkurve erstellt und durch die Extinktion der Probelösung deren Proteingehalt über die Eichkurve errechnet. Der so erhaltene Wert wird durch Reproduktion bestätigt.

Coaten der Mikrotiterplatten

Mittels Coating-Puffer wird das Antigen auf 0,1 mg pro ml verdünnt. In die Cups von Rundbodenmikrotiterplatten werden jeweils 50 µl der Lösung (entsprechend 5 µg Antigen) pipettiert und für 18 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4° C inkubiert. Das Antigen bindet sich in dieser Zeit physikalisch an die Oberfläche der Platte (ENGVAL, PERLMANN 1971, 1972). Um nicht gebundene Antigene zu entfernen, werden die Cups mehrfach mit 150 µl PBS-Tween gewaschen. Im Anschluß werden die Cups mit 100 µl 1%igem Rinderserumalbumin beschickt und für drei Stunden bei Raumtemperatur belassen. In dieser Zeit bindet das Rinderserumalbumin an die nicht durch Antigen besetzten Stellen der Mikrotiterplatten. Nach Abpipettieren des Rinderserumalbumins werden die Cups erneut mehrfach mit je 150 µl PBS-Tween gewaschen.

1. Einleitung

Vorbereiten und Pipettieren der Proben

Die zu untersuchenden Mäuseseren werden im Wasserbad zunächst für 30 Minuten auf 56° C erhitzt. Nach dieser Inaktivierung werden die Proben in PBS-Tween auf 1:50 verdünnt und eine Verdünnungsreihe über acht Zweierpotenzen bis auf 1:6400 hergestellt.

Bei Vierfachbestimmung können pro Platte zwei Proben untersucht werden. Hierzu werden jeweils 50 µl der verdünnten Probe in die gecoateten Cups pipettiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	R	R	
B		P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	R	R	
C		P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	R	R	
D		P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	R	R	
E		P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	R	R	
F		P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	R	R	
G		P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	R	R	
H		P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	P2	R	R	
	1:50				bis				1:6400			
P1	:	Verdünnungsreihe Probe 1										
P2	:	Verdünnungsreihe Probe 2										
R	:	Reagenzienleerwert										

Abb. 4

: Probenverteilung auf den Mikrotiterplatten für den ELISA

Während zweistündiger Inkubation bei 37° C in einer feuchten Kammer binden die in der Probe vorhandenen AK an die fixierten AG. Die Proben werden abpipettiert und die Cups mit 150 µl PBS-Tween mehrfach gespült.

Auswertung

Die Auswertung erfolgt photometrisch bei 492 nm gegen den Reagenzienleerwert. Zuvor werden 50 µl der Anti-Maus-Peroxidase (1:300) pro Cup pipettiert und nach einer Stunde Inkubation bei 37° C 100 µl OPD-Lösung pro Cup zugegeben. Die Proben werden bei Raumtemperatur für weitere 30 Minuten im Dunkeln belassen und dann je 25 µl 2,5 N HCl als Stopplösung zugegeben. Im Anschluß erfolgt die Messung.

1. Einleitung

Neutralisationstest zur Antikörperbestimmung

Während MELNICK 1955 maßgeblich an der Entwicklung dieses Tests beteiligt war, wurde er von COMMITTEE schon 1957 routinemäßig in der immunologischen Diagnostik eingesetzt.

Eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Seren wird mit einer konstanten Virusverdünnung auf einen Monolayer gegeben. Nach Inkubation wird der Zellrasen bezüglich CPE ausgewertet (TYRELL, HORSFALL 1958, CASALS 1967). Die eventuell vorhandenen Antikörper bewirken eine direkt proportionale Inhibierung des CPE. Durch Titration ist eine Quantifizierung der Antikörper möglich und durch geeignete Kontrollansätze kann eine Virusspezifität der Antikörper bewiesen werden (NUZZOLO, VELLUCCI 1983).

0. Bestimmung der ID₅₀

Die Bestimmung der ID₅₀ erfolgt mittels Titration nach der Endverdünnungsmethode. Hierzu wird von der EMC-Virussuspension eine logarithmische Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻⁸ hergestellt.

Von zwei Flachbodenmikrotiterplatten werden die äußeren Cups als Verdunstungsschutz mit 100 µl PBS beschickt. In die inneren Cups werden neben 25 µl AM jeweils 25 µl der Virusverdünnung pipettiert, mit Ausnahme einer auf jeder Platte mitlaufenden Zellkontrolle. Von der schwächsten Konzentration ausgehend, werden die Proben pipettiert und von jeder Verdünnungsstufe wird eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. In jedes Cup werden 5.000 L-Zellen in 50 µl WM (entsprechend 100.000 Zellen pro ml) gegeben, die Platten mit dem Deckel verschlossen und bei 37° C inkubiert. Es erfolgt eine tägliche lichtmikroskopische Kontrolle des CPE.

1. Einleitung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	S	P	P	P	P	P	P	P	P	P	ZK	S
C	S	P	P	P	P	P	P	P	P	P	ZK	S
D	S	P	P	P	P	P	P	P	P	P	ZK	S
E	S	P	P	P	P	P	P	P	P	P	ZK	S
F	S	P	P	P	P	P	P	P	P	P	ZK	S
G	S	P	P	P	P	P	P	P	P	P	ZK	S
H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
		10^{-4}	$10^{-4,5}$	10^{-5}	$10^{-5,5}$	10^{-6}	$10^{-6,5}$	10^{-7}	$10^{-7,5}$	10^{-8}		

S : Verdunstungsschutz (100 µl PBS)
 ZK : Zellkontrolle
 P : Virusverdünnungen von 10^{-4} bis 10^{-8}

Abb. 5

: Probenverteilung zur Bestimmung der ID50

Vorbereitung der Seren

Die tiefgefrorenen Seren werden im Wasserbad für 30 Minuten auf 56° C erhitzt. Hierdurch werden unspezifische Serumbestandteile, die die Neutralisation beeinflussen (z.B. Complement), inaktiviert. Anschließend werden die Seren über neun Stufen von 1:5 bis 1:1.280 in AM verdünnt.

Pipettieren der Proben

Pro Flachbodenmikrotiterplatte (Fa. Falcon) wird eine Probe in acht Verdünnungsstufen jeweils sechsfach ausgetestet. Weiterhin enthält jede Platte eine Zellkontrolle sowie eine Viruskontrolle mit 100 ID50 (hier: 10-3,86 pro 25 µl).

1. Einleitung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	S	P	P	P	P	P	P	P	P	VK	ZK	S
C	S	P	P	P	P	P	P	P	P	VK	ZK	S
D	S	P	P	P	P	P	P	P	P	VK	ZK	S
E	S	P	P	P	P	P	P	P	P	VK	ZK	S
F	S	P	P	P	P	P	P	P	P	VK	ZK	S
G	S	P	P	P	P	P	P	P	P	VK	ZK	S
H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	1:10				bis				1:1.280			

S : Verdunstungsschutz (100 µl PBS)

ZK : Zellkontrolle

VK Viruskontrolle (100. IN)

Seitenschwundungswert von 1 bis 1200

Abb. 6

: Probenverteilung für den Neutralisationstest

Die äußeren Cups werden zunächst mit 100 µl PBS gefüllt und dienen als Verdunstungsschutz. Jeweils 25 µl der verdünnten Proben werden in die Cups pipettiert, Zellkontrolle und Viruskontrolle erhalten 25 µl AM. Zu jeder Probe sowie zu Viruskontrolle werden 25 µl der Virusverdünnung 100 ID50 gegeben. Die Zellkontrolle erhält 25 µl PBS pro Cup.

Nach Inkubation für eine Stunde bei 37° C wird allen Cups 50 µl WM mit 5.000 L-Zellen (entsprechend 100.000 Zellen pro ml) zugesetzt und weiter bei 37° C inkubiert. Bei täglichen lichtmikroskopischen Kontrollen wird die Serumverdünnung bestimmt, unter der ein 50%iger CPE eintritt. Diese Konzentration mit neutralisierendem Antikörpertiter wird protokolliert, das Ergebnis statistisch bearbeitet.

- Kontrollansätze

Durch 100%igen CPE der Viruskontrolle wird die Infektiosität der Viren überprüft. Bei Inkubieren der Viren mit Seren nicht infizierter Mäuse wird eine vollständige Lyse der Monolayern beobachtet. Eine unspezifische Virusneutralisation kann somit ausgeschlossen werden.

Um zu zeigen, daß die Lyse ausschließlich durch EMC-Viren und nicht durch im Serum enthaltene Stoffe verursacht wird, werden L-Zellen mit Mäuseserum ohne Viruszusatz inkubiert.

1. Einleitung

Eine Virusspezifität der Antikörper gegenüber EMC-Viren wird durch einen protektiven Effekt der Seren bei Zugabe von EMC-Viren, nicht jedoch bei Zugabe eines anderen Virus (hier: VS-Virus) in gleicher Konzentration gezeigt (GRIST et al. 1966).

1.

Ergebnisse

1.

Ergebnisse der Intravitalbeobachtungen

Beobachtet und protokolliert werden Gewichts- und Krankheitsverläufe sowie die Sterberaten bis Tag 12.

1.

Ergebnisse der Vorversuche

Zum Ausschluß eines Einflusses der verschiedenen Futtersorten auf den Gewichtsverlauf werden je zehn nicht infizierte Tiere mit Standardfutter, mit cholesterinreicher Diät sowie mit Isoprinosine angereichertem Futter ernährt und der Gewichtsverlauf kontrolliert. Am Tag 12 wird der Cholesterinspiegel bestimmt.

1.

Gewichtsverlauf

Tag	Kontrolle	Isprinosine	Cholesterin
0	24,1 ± 1,3	24,2 ± 1,2	24,1 ± 1,6
2	25,1 ± 1,2	25,4 ± 1,4	25,2 ± 1,5
4	26,5 ± 1,5	26,8 ± 1,7	26,5 ± 1,4
6	28,0 ± 1,8	28,1 ± 1,6	27,9 ± 1,4
8	30,1 ± 1,7	29,7 ± 1,8	29,5 ± 1,6
10	31,2 ± 1,6	31,0 ± 1,9	30,7 ± 1,8
12	31,8 ± 1,9	32,0 ± 1,8	31,1 ± 1,8

Tab. 1

: Gewichtsverlauf nicht infizierter Tiere zwischen Tag 0 und 12

(Mittelwerte [g] \pm Standardabweichung)

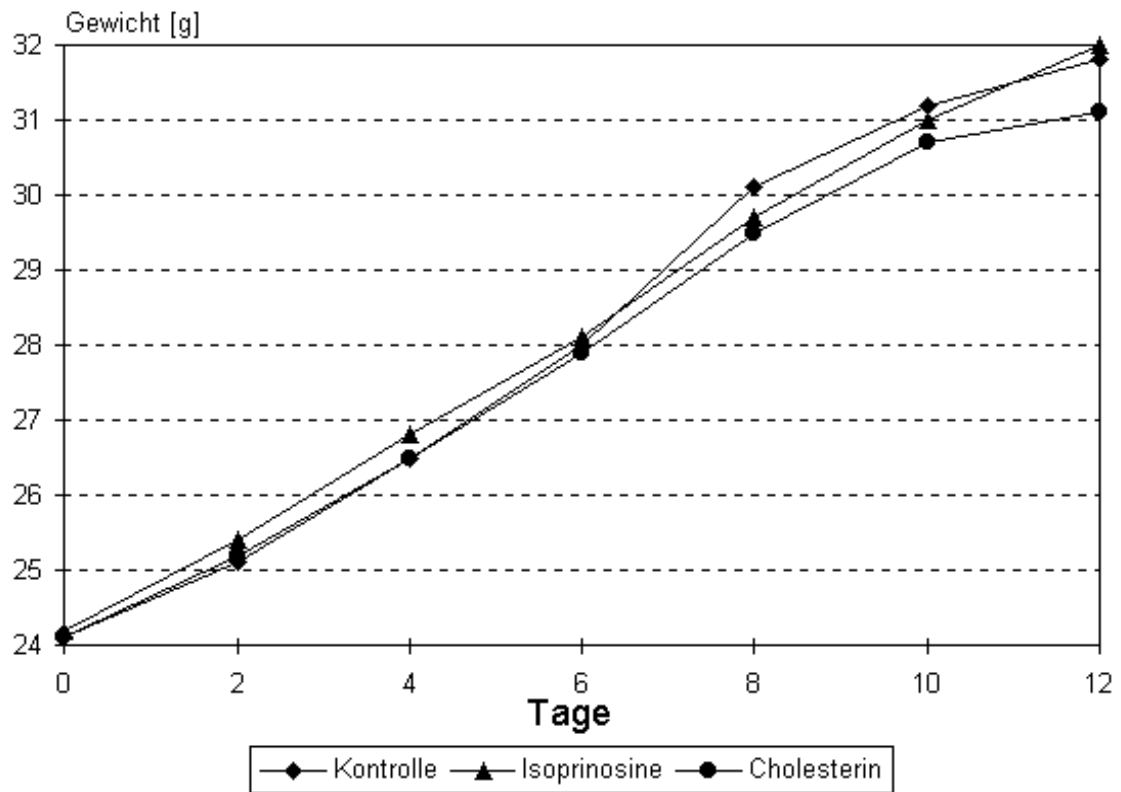


Abb. 7

: Graphische Darstellung des in Tabelle 1 gezeigten Gewichtsverlaufs.

Durch den aus Tabelle 1 und Abbildung 7 erkennbaren gleichartigen Gewichtsverlauf ohne signifikante Abweichungen zwischen Tag 0 und 12 kann ein Einfluß der verschiedenen Futtersorten auf das Gewicht ausgeschlossen werden.

1. Einleitung

Am Tag 12 p.i. wird der Blutholesterinspiegel der über zwölf Tage unterschiedlich ernährten Tiere bestimmt.

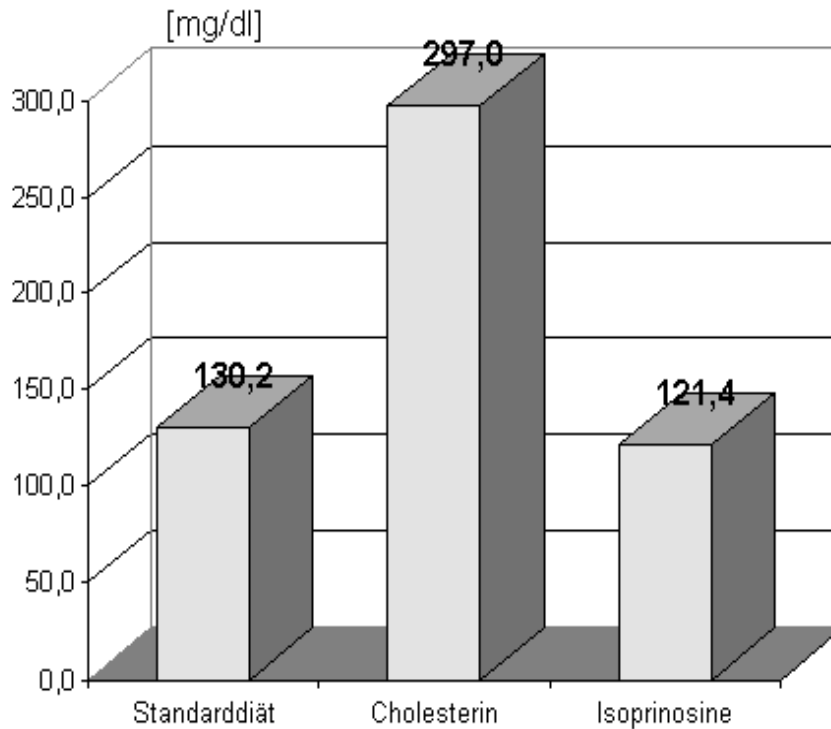


Abb. 8

: Blutholesterinspiegel am Tag 12

Wie Abbildung 8 zeigt, ergibt sich für die mit cholesterinreicher Diät gefütterten Tiere ein Blutholesterinspiegel von 297,0

$\pm 11,39$ mg/dl. Dieser ist gegenüber dem bei den beiden anderen Gruppen gemessenen Blutholesterinspiegel hoch signifikant erhöht ($p < 0,01$). Zwischen der mit Isoprinosine therapierten Kontrollgruppe ($121,4 \pm 7,50$ mg/dl) und der mit Standardfutter ernährten Kontrollgruppe ($130,2 \pm 8,64$ mg/dl) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Während bei der cholesterinreich gefütterten Gruppe die gewünschte Erhöhung des Blutholesterinspiegels festgestellt wird, kann ein Einfluß von Isoprinosine auf den Cholesterinspiegel ausgeschlossen werden.

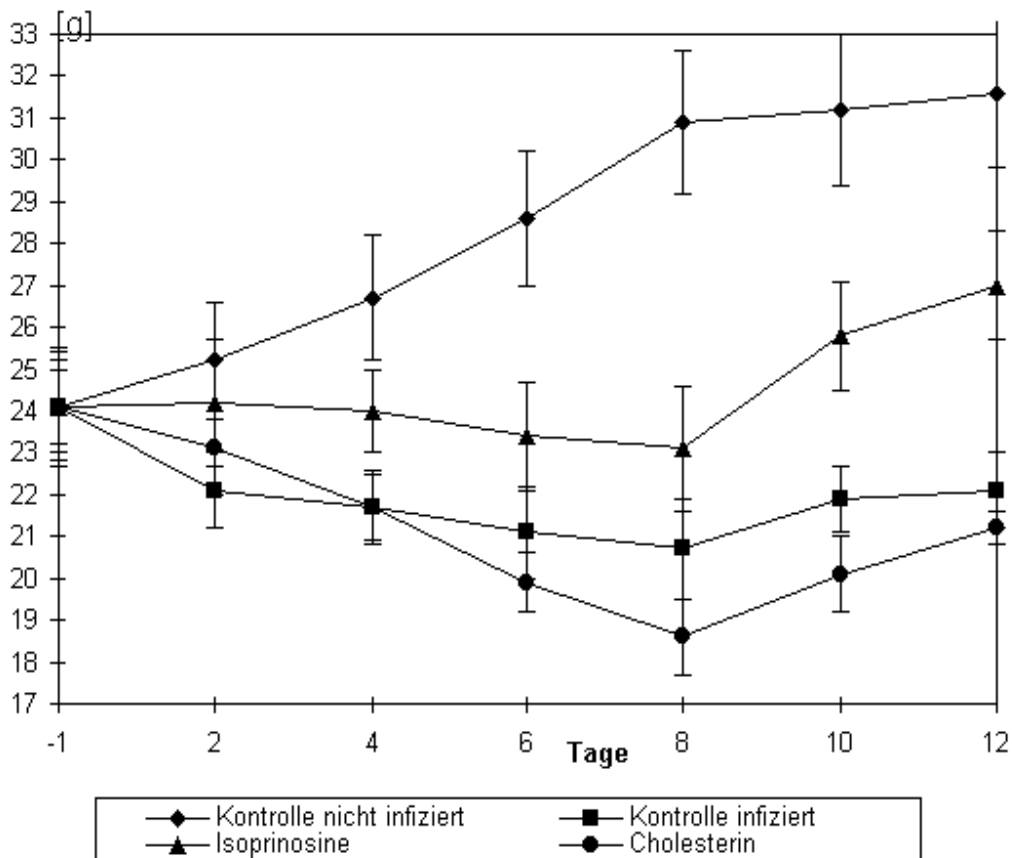
Gewichtsverläufe unter Infektion

Tag	Kontrolle	Kontrolle inf.	Isprinosine	Cholesterin
-1	24,1 ± 1,3	24,1 ± 0,9	24,1 ± 1,4	24,1 ± 1,1
2	25,2 ± 1,4	22,1 ± 0,9	24,2 ± 1,5	23,1 ± 1,1
4	26,7 ± 1,5	21,7 ± 0,9	24,0 ± 1,0	21,7 ± 0,8
6	28,2 ± 1,6	21,1 ± 1,1	23,4 ± 1,3	19,9 ± 0,7
8	30,9 ± 1,7	20,7 ± 1,2	23,1 ± 1,5	18,6 ± 0,9
10	31,2 ± 1,8	21,9 ± 0,8	25,8 ± 1,3	20,1 ± 0,9
12	31,6 ± 1,8	22,1 ± 0,9	27,0 ± 1,3	21,2 ± 0,4

Tab. 2

: Gewichtsverlauf infizierter Tiere zwischen Tag -1 und 12

(Mittelwerte [g] ± Standardabweichung)



1. Einleitung

Abb. 9

: Graphische Darstellung des in Tabelle 2 gezeigten Gewichtsverlaufs

Wie aus Tabelle 2 und Abbildung 9 ersichtlich, findet bei den nicht infizierten Kontrolltieren bis Tag 12 eine Gewichtszunahme von 7,5 g statt. Bereits ab Tag 4 sind diese Tiere signifikant schwerer ($p < 0,05$) als alle infizierten Tiere.

Bei den infizierten Tieren fällt zwischen Infektionstag und Tag 8 zunächst ein Rückgang des Körpergewichts auf, bis ab Tag 8 wieder eine Gewichtszunahme in allen Gruppen zu beobachten ist. Die mit Isoprinosine therapierten Mäuse zeigen eine Gewichtsabnahme von nur 1 g zwischen Infektionstag und Tag 8, während bei den mit cholesterinreicher Diät gefütterten Tiere ein Rückgang des Körpergewichts um 5,5 g zu verzeichnen ist. Auch hier liegt ein signifikantes Ergebnis vor.

Bis Tag 12 bleiben die nicht infizierten Tiere mit 31,6 g signifikant schwerer ($p < 0,05$) als alle infizierten Tiere. Unter diesen sind die mit Isoprinosine therapierten Tiere am Tag 12 signifikant schwerer als die nicht therapierten und die mit cholesterinreicher Diät gefütterten Tiere. Zwischen den beiden letztgenannten Gruppen ergeben sich sowohl im Verlauf als auch am Tag 12 keine signifikanten Gewichtsunterschiede.

Die folgende Graphik zeigt die prozentuale Gewichtsveränderung im Verlauf der Infektion, wobei das Gewicht am Tag -1 100% entspricht.

1. Einleitung

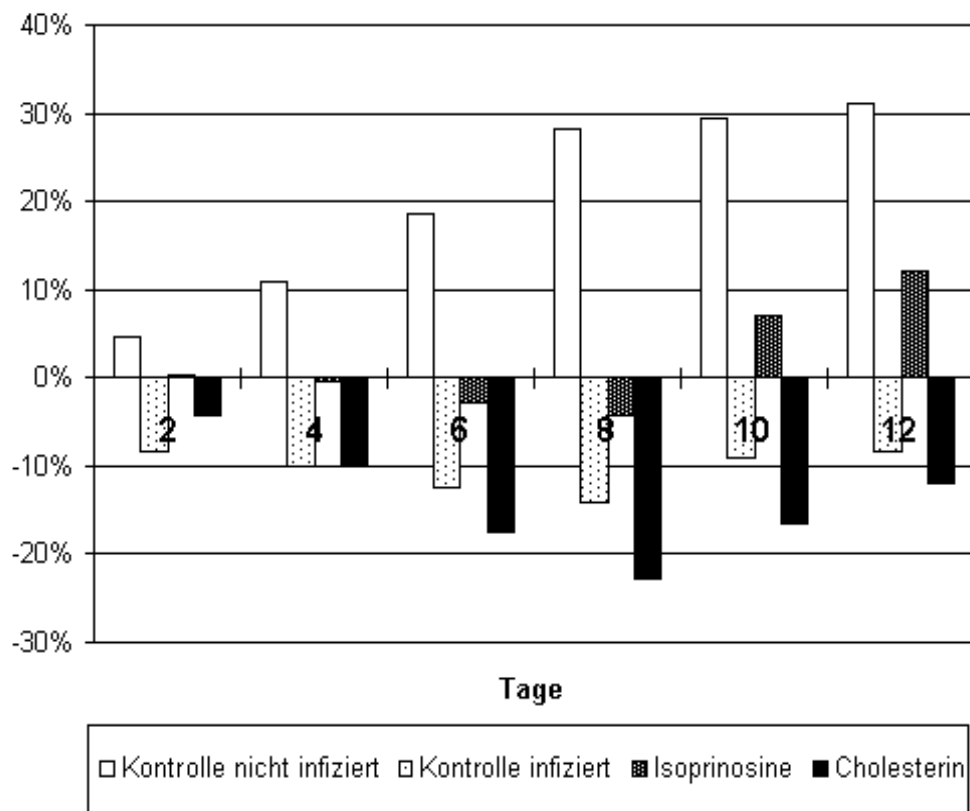


Abb. 10

: Prozentuale Gewichtsveränderung während der Infektion

Die Abbildung 10 verdeutlicht noch einmal, daß in der mit Isoprinosine therapierten Gruppe eine Gewichtszunahme unter der Krankheit erzielt werden kann, während die nicht therapierte und die mit cholesterinreicher Diät ernährten Tiere am Tag 12 deutlich unter ihrem Ausgangsgewicht liegen.

Krankheitsverlauf

Bei der täglichen Inspektion werden die Tiere auf Paresen, vor allem der hinteren Extremitäten, untersucht. Diese Paresen werden durch eine Enzephalomyelitis, bedingt durch die EMC-Virusinfektion, hervorgerufen.

1. Einleitung

An allen Tagen sind die nicht infizierten Tiere symptomfrei, bei den infizierten Gruppen ergibt sich folgender Krankheitsverlauf:

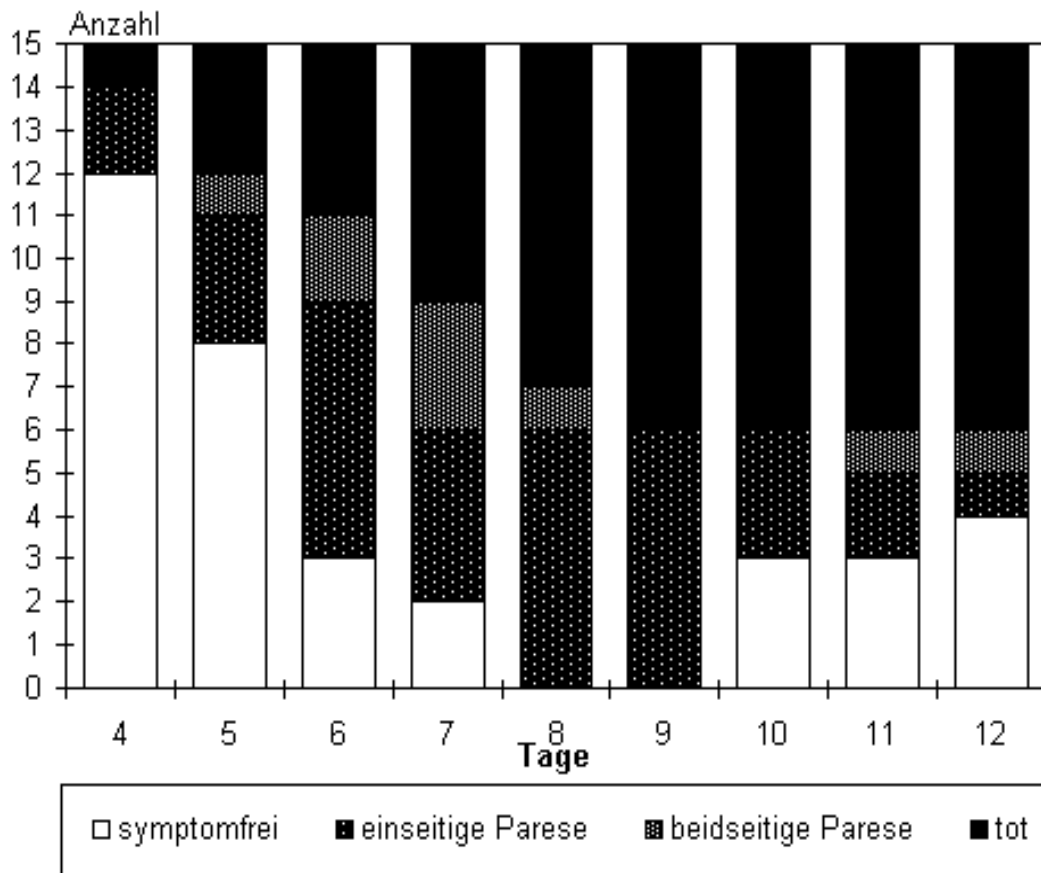


Abb. 11

: Krankheitsverlauf ohne Therapie

1. Einleitung

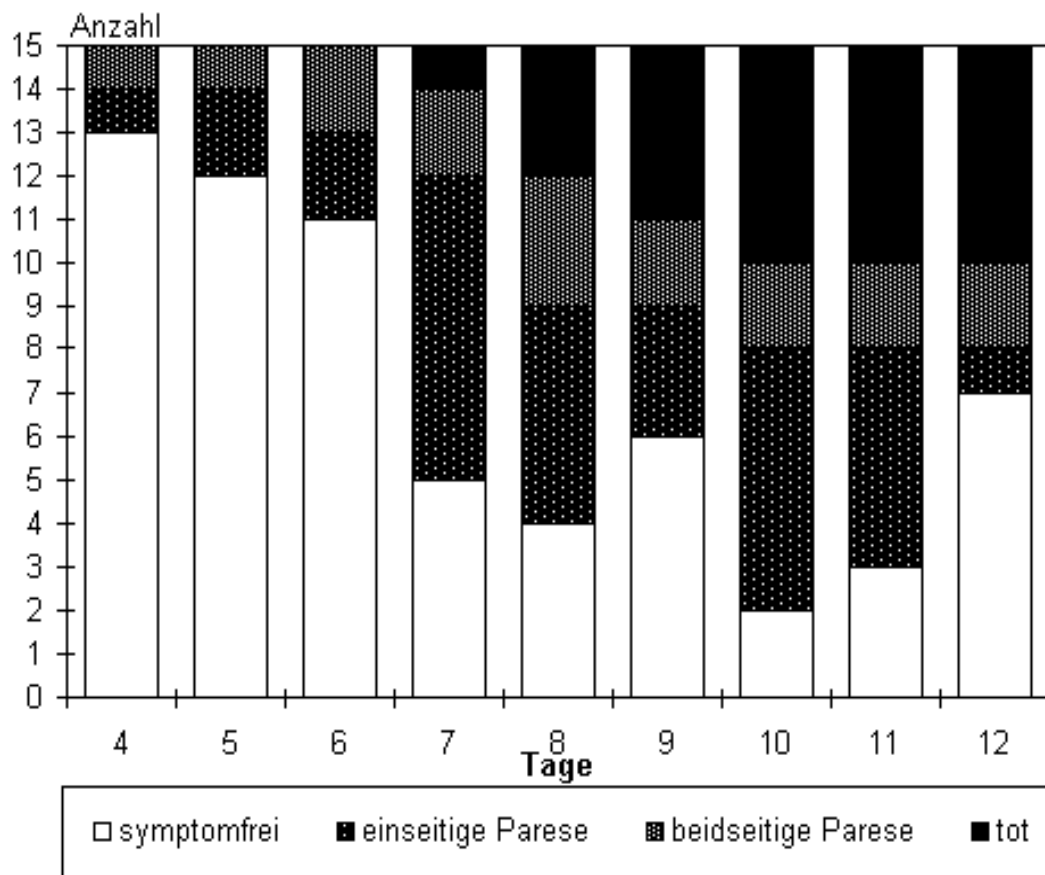


Abb. 12

: Krankheitsverlauf unter Isoprinosinetherapie

1. Einleitung

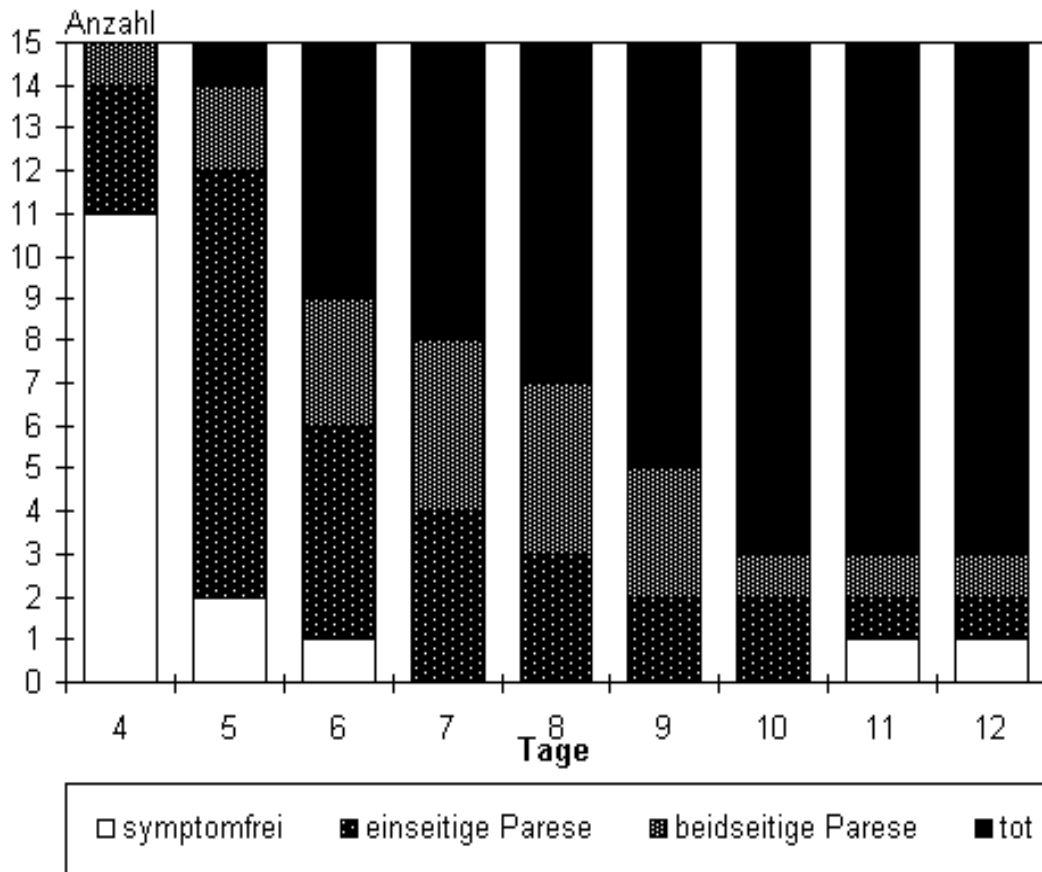


Abb. 13

: Krankheitsverlauf unter cholesterinreicher Diät

In allen Gruppen zeigen sich erste Symptome am Tag 4. Ein jeweiliges Maximum der Symptomausprägung ist in allen Gruppen zwischen Tag 7 und Tag 10 zu verzeichnen. Auffällig ist jedoch der deutlich schwächere Krankheitsverlauf in der mit Isoprinosine therapierten Gruppe hinsichtlich Paresen und Sterberaten, verglichen mit der nicht therapierten, sowie der cholesterinreich gefütterten Gruppe. Während in der cholesterinreich ernährten Gruppe nur drei Tiere die akute Infektion überleben, sind in der nicht behandelten Gruppe am Tag 12 noch sechs, in der mit Isoprinosine therapierten Gruppe sogar zehn Tiere am Leben. Diese werden am Tag 12 getötet und die Herzen histopathologisch aufgearbeitet.

• Ergebnisse der histopathologischen Begutachtung

Die aufgearbeiteten Herzen der nicht infizierten und nicht behandelten Tiere zeigen keinerlei Organveränderungen. Auch die Organe der nicht infizierten, mit Isoprinosine behandelten sowie die nicht infizierten, cholesterinreich ernährten Tiere sind in der histologischen Begutachtung unauffällig.

1. Einleitung

Unter den infizierten Gruppen zeigen die mit Isoprinosine therapierten Tiere eine schwächere Ausprägung der Myokarditis bei geringeren lymphozytären Infiltraten, sowie deutlich weniger Nekroseherde. Die folgende Darstellung zeigt die prozentuale Verteilung der untersuchten Parameter in den verschiedenen Gruppen, bezogen auf die Anzahl der überlebenden Tiere am Tag 12.

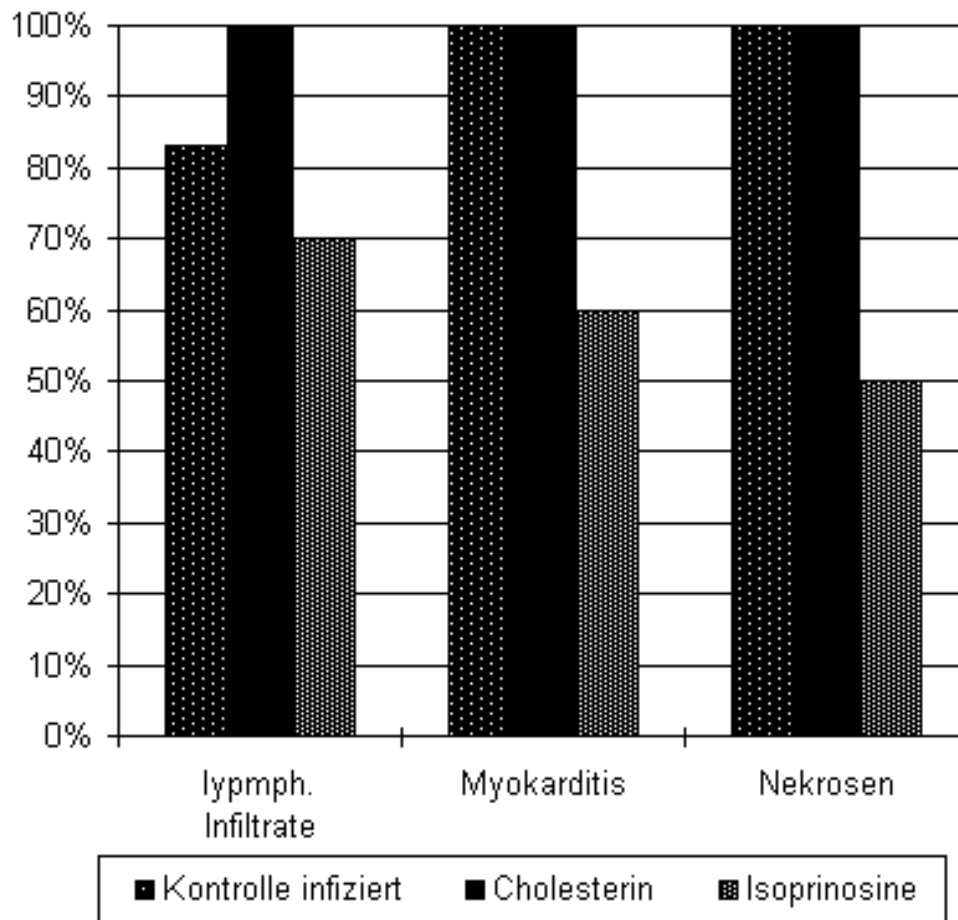


Abb. 14

: Histopathologische Veränderungen der Herzen am Tag 12 p.i.

• Ergebnisse des Interferonnachweises

1. Ergebnisse der Vorversuche

1. Einleitung

Es werden zunächst die Vorversuche ausgewertet, um eventuelle, das Meßergebnis beeinflussende Faktoren nicht als systematischen Fehler in die Auswertung des Testes mit einzubeziehen.

1.

Auswertung der Sterilitätsprüfungen

Die regelmäßig durchgeführten Sterilitätsprüfungen ergeben zu keiner Zeit einen Hinweis auf das Vorliegen einer bakteriellen Kontamination.

Ausgleich des Effektes von Mäuseserum auf das Zellwachstum

Durch Zugabe von 6% FCS zum RPMI-Medium ergibt sich bei der Inkubation über 18 Stunden ein gleiches Zellwachstum wie unter Zusatz von 1% murinem Probenserum zum Medium, entsprechend der verwendeten Verdünnung im Versuchsansatz.

Auswertung der UV-bestrahlten Interferoneichreihe

Bei Auswertung der zehn Minuten mit UV-Licht bestrahlten Eichreihe ergeben sich bezüglich IFN-Aktivitäten gleiche Werte wie bei der nicht bestrahlten Eichreihe. Ein Einfluß von zehnminütiger UV-Bestrahlung auf die IFN-Aktivität kann somit ausgeschlossen werden.

Einfluß von Isoprinosine und Cholesterin auf die IFN-Produktion

Die nicht infizierten Tiere zeigen allesamt nicht meßbare IFN-Spiegel, ob unbehandelt, mit Isoprinosine therapiert oder mit cholesterinreicher Diät gefüttert. Somit liegt keine IFN-Induktion bei gesunden Tieren durch bloße Gabe von Isoprinosine oder Cholesterin vor.

Eichreihe

1. Einleitung

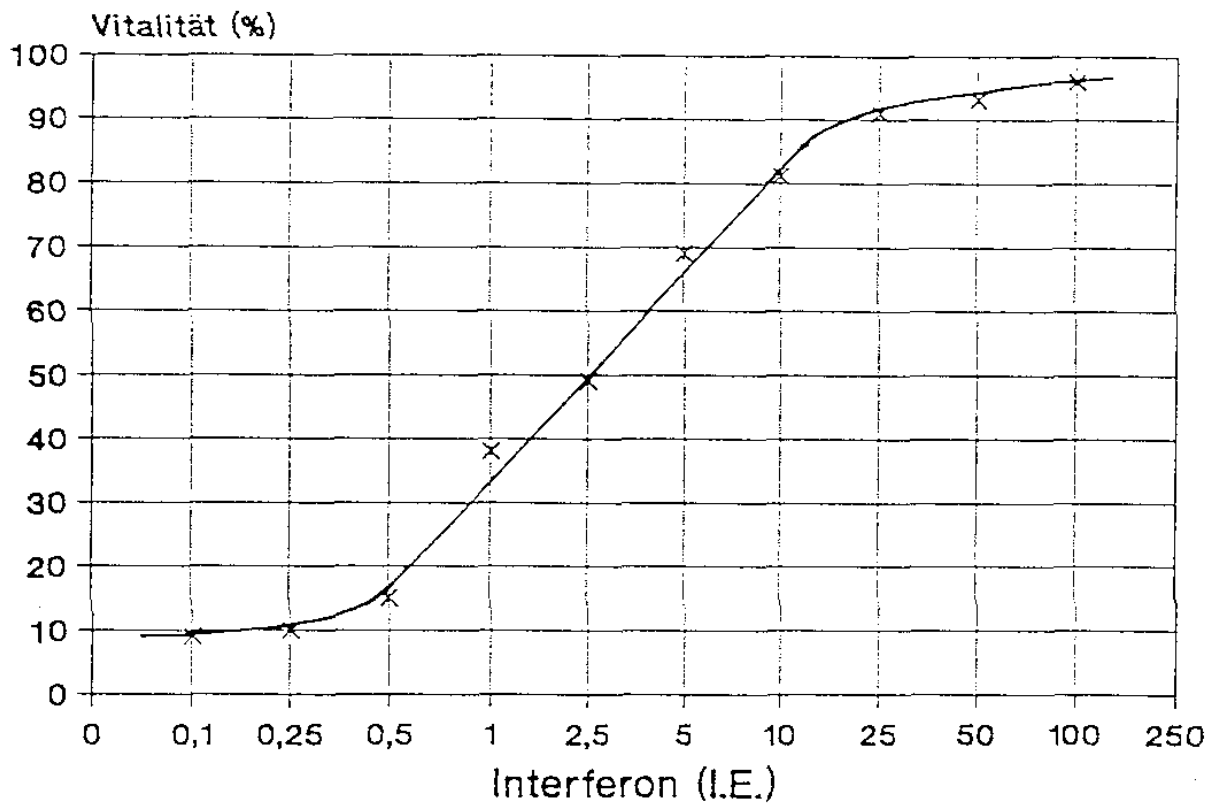


Abb. 15

: Halblogarithmische Darstellung (log 10) der Eichreihe des IFN-Standards

Ein linearer Kurvenverlauf und somit direkter Zusammenhang zwischen Vitalität der Zellen [%] und im Medium enthaltenem Interferon [I.E.] ergibt sich nur zwischen 15% und 85% Zellvitalität. Bei gemessenen Vitalitäten jenseits dieser Grenzen läßt sich dadurch keine IFN-Konzentration zuordnen.

• Ergebnisse der Serumauswertungen

Zur Bestimmung der IFN-Titer wird an den Tagen 4, 8 und 12 aus jeder Gruppe von jeweils sechs Tieren Serum gewonnen. Die gemessenen IFN-Titer sind folgender Tabelle zu entnehmen:

Tag	Kontrolle inf.	Isprinosine	Cholesterin
4	7,80 ± 0,40	9,10 ± 0,50	6,60 ± 0,50
8	0,67 ± 0,05	0,82 ± 0,08	0,56 ± 0,05

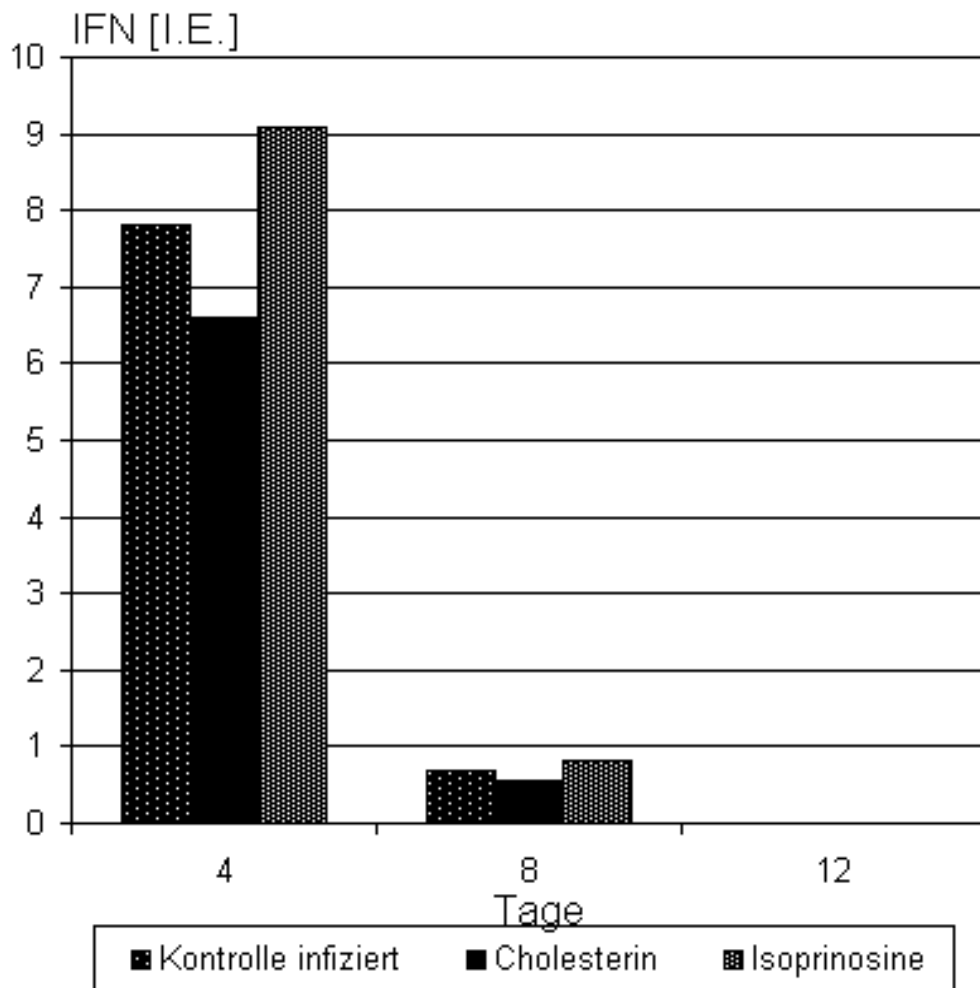
Tab. 3

: IFN-Titer infizierter Tiere Tag 4 und 8

(Mittelwerte [IE/ml] ± Standardabweichung)

1. Einleitung

Da am Tag 12 p.i. die gemessenen Zellvitalitäten in allen Gruppen zwischen 0 und 0,7 % und somit außerhalb des linearen Eichkurvenverlaufs liegen, lassen sich mit dieser Methode hier keine IFN-Konzentrationen mehr zuordnen.



-

Abb. 16

: Graphische Darstellung von Tabelle 3

Dies bedeutet im Gruppenvergleich eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) des IFN-Titers in der Isoprinosine-Gruppe gegenüber den beiden anderen Gruppen an den Tagen 4 und 8. Am Tag 4 ist der Interferontiter der Cholesteringruppe auch gegenüber der infizierten, nicht behandelten Kontrolle signifikant erniedrigt ($p < 0,05$).

1. Einleitung

• Ergebnisse des Plaquetestes zur Virustiterbestimmung in Myokard und Milz

An den Tagen 3 bis 6 werden jeweils Herz und Milz von sechs Tieren aus jeder Gruppe entnommen und die Virustiter bestimmt.

1.

Ergebnisse der Vorversuche

Bei den Sterilitätsproben ergibt sich kein Hinweis auf Superinfektion. Die Asservate der nicht infizierten Tiere zeigen im Plaquetest keine Reaktion. Für toxische oder andere Einflüsse auf die L-Zellkulturen und somit auf das Versuchsergebnis findet sich kein Anhalt.

Viruskonzentration im Myokard

-

Tag	Kontrolle inf.	Isprinosine	Cholesterin
3	227 ± 55	83 ± 33	221 ± 91
4	643 ± 149	497 ± 120	491 ± 134
5	531 ± 149	443 ± 88	428 ± 110
6	216 ± 76	279 ± 69	243 ± 61

Tab. 4

: Virustiter im Myokard Tag 3 bis 6

(Mittelwerte [pfu/ml x 10³] ± Standardabweichung)

1. Einleitung

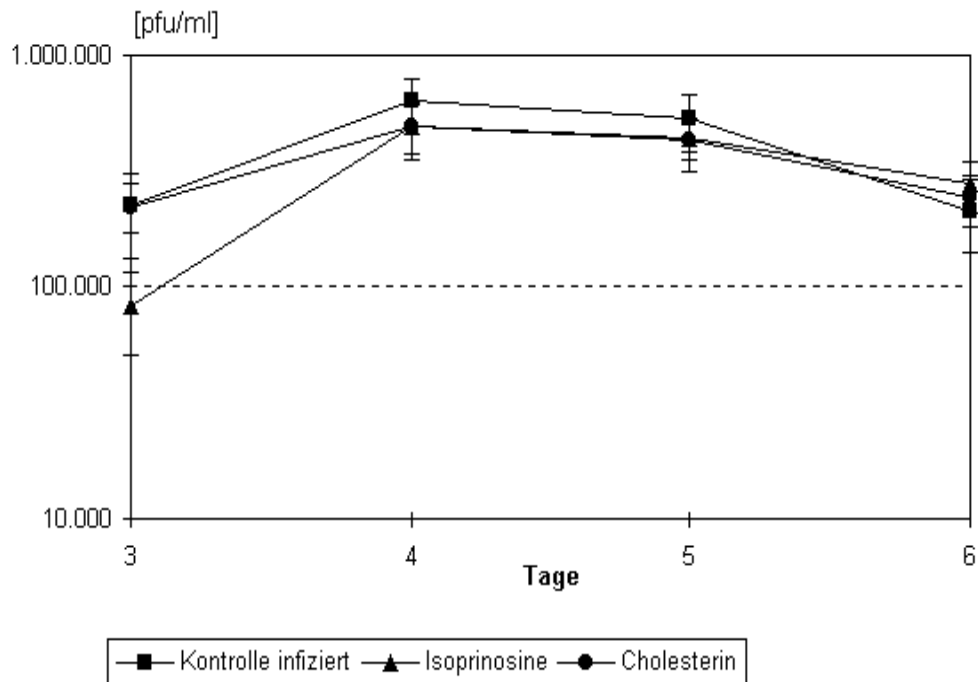


Abb. 17

: Graphische Darstellung der Tabelle 4

Der Virustiterverlauf zeigt in allen Gruppen ein ähnliches Profil. Jeweils ergibt sich ein Maximum der Viruskonzentration im Myokard am Tag 4 p.i., mit einer deutlichen Steigerung gegenüber Tag 3 p.i.. Die Myokardasservate der infizierten, nicht behandelten Kontrollgruppe enthalten an den Tagen 4 und 5 einen deutlich höheren Virustiter als die anderen beiden Gruppen.

Signifikante Unterschiede sind jedoch aufgrund der großen Streuung der Einzelwerte nicht feststellbar.

• Viruskonzentration im Milzgewebe

Tag	Kontrolle inf.	Isprinosine	Cholesterin
3	184 ± 60	169 ± 58	313 ± 76
4	407 ± 89	63 ± 28	223 ± 89
5	58 ± 20	21 ± 8	77 ± 26
6	37 ± 11	9 ± 2	19 ± 5

Tab. 5

: Virustiter im Milzgewebe Tag 3 bis 6

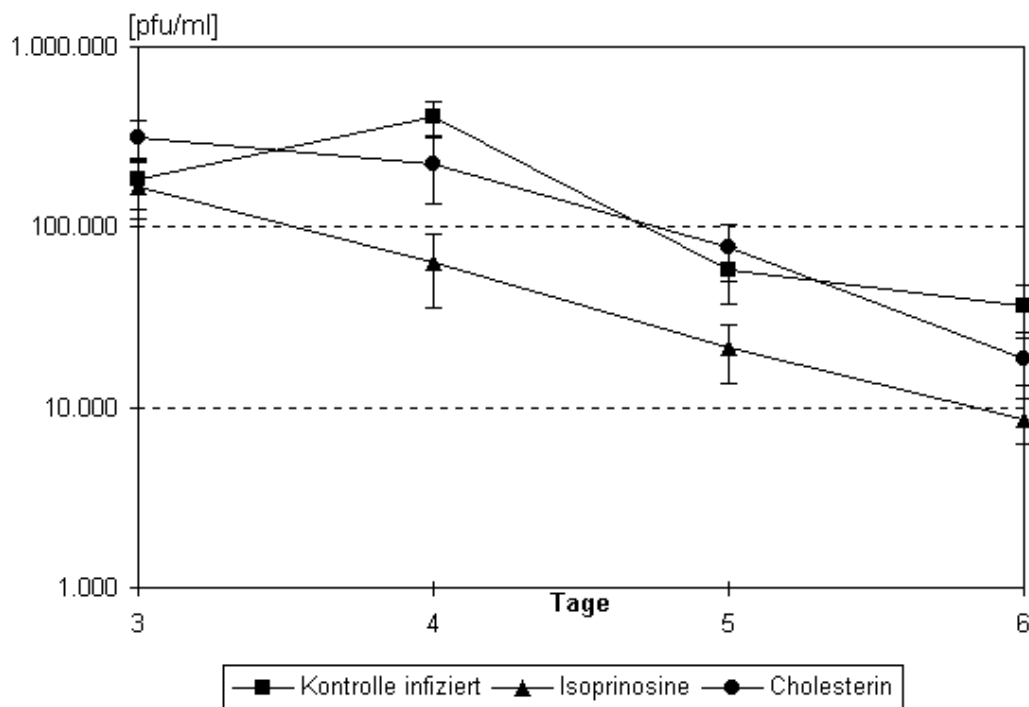
(Mittelwerte [pfu/ml $\times 10^3$] \pm Standardabweichung)

Abb. 18

: Graphische Darstellung der Tabelle 5

Abweichend zum Myokard ergeben sich hier unterschiedliche Profile der Virustiterverläufe. Die infizierte Kontrolle zeigt im Milzgewebe ein Maximum des Virustiters mit 400.000 pfu/ml am Tag 4 p.i., jedoch mit steilerem Abfall. Die mit cholesterinreicher Diät gefütterten Tiere, sowie die mit Isoprinosine behandelten Tiere zeigen vom Tag 3 an eine stetige Abnahme der Virustiter im Milzgewebe. Die Werte der Isoprinosine-Gruppe liegen dabei an allen Tagen signifikant unter denen der Cholesterin-Gruppe und ab Tag 4 auch signifikant besser als die der infizierten Kontrolle. Zwischen den beiden anderen Gruppen liegen die Virustiter der infizierten Kontrolle am Tag 3 signifikant unter denen der Cholesterin-Gruppe, an den Tagen 4 und 6 zeigt jedoch die Cholesterin-Gruppe signifikant bessere Ergebnisse. Am Tag 5 sind zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

1. Einleitung

Auswertung des ELISA zum Antikörpernachweis

1.

Ergebnis der Bestimmung des Proteingehalts des Antigenkonzentrats

Bei der Bestimmung des Proteingehalts des Antigenkonzentrats ergeben sich 2,98 mg Eiweiß pro ml Konzentrat.

Auswertung der Proben

Schon makroskopisch zeigen sich nach Zugabe der Stopplösung keine Unterschiede in der Intensität der Blaufärbung zwischen Kontroll- und Probencups. Dieses Ergebnis wird durch die Extinktionsmessung der Cups bei 492 nm im ELISA-Photometer bestätigt.

Der ELISA zur Bestimmung von Antikörpertitern gegen das EMC-Virus muß in diesem Ansatz als gescheitert angesehen werden. Auch Modifikationen des Versuchsaufbaus, wie weiteres Reinigen und Konzentrieren des Antigens, Variieren der zum Coaten verwendeten Antigenkonzentration und Wechsel der Mikrotiterplatten bringen kein verwertbares Ergebnis.

Auswertung des Neutralisationstestes zum Antikörpernachweis

1.

Bestimmung der ID₅₀

1. Einleitung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	S	+	+	+	-	-	-	-	-	-	ZK	S
C	S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	ZK	S
D	S	+	+	+	-	-	-	-	-	-	ZK	S
E	S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	ZK	S
F	S	+	+	+	+	-	-	-	-	-	ZK	S
G	S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	ZK	S
H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
		10^{-4}	$10^{-4,5}$	10^{-5}	$10^{-5,5}$	10^{-6}	$10^{-6,5}$	10^{-7}	$10^{-7,5}$	10^{-8}		

- 10^x : Virusverdünnungsstufe
 (+) : deutlicher zytopathischer Effekt
 (-) : kein zytopathischer Effekt
 ZK : Zellkontrolle
 S : Verdunstungsschutz (100 μ l PBS)

Abb. 19

: Mikrotiterplatte zur Bestimmung der ID₅₀, 24 Stunden p.i.

Anhand dieser Ergebnisse kann die ID₅₀ nach der Methode von FAZEKAS DE ST. GROTH (1955) berechnet werden:

Das Bild der markierten Spalten $10^{-5,5}$ und 10^{-6}

ergibt beim Addieren:

positive Spalte: 4 - 3

negative Spalte: -2 - -3

Kumulation der pos. nach rechts: 7 - 3

Kumulation der neg. nach links : -2 - -5

ergibt als Differenz pro Spalte: 5 - -2

Bildung der Distanz: 5 - (-2)

Proportionen: $5/7 = x/0,5$

Ergibt nach x aufgelöst: 0,36

1. Einleitung

Addieren der Ausgangsstufe der Berechnung: $5,5 + 0,36 = 5,86$.

Somit ergibt sich die ID50 des Viruspools bei einer Verdünnung von $10^{-5,86}$ pro 25 μl , die 100 ID50 liegt dementsprechend bei $10^{-3,86}$ pro 25 μl .

Auswertung der Kontrollansätze

Bei den Seren nicht infizierter Mäuse kann kein zytoprotektiver Effekt festgestellt werden. Für toxische Einflüsse der Mäuseseren auf die L-Zellen ergibt sich kein Anhalt. Bei Austestung der am Tag 12 gewonnenen Mäuseseren zeigt sich in keiner der Gruppen ein zytoprotektiver Effekt gegenüber VS-Viren.

Auswertung der Proben

Während des Zeitraums von Tag 4 bis Tag 12 war in allen Gruppen eine exponentielle Steigerung der Antikörperantwort nachweisbar. Unter Isoprinosinetherapie zeigt sich eine protektive Wirkung der Mäuseseren auf die L-Zellen am Tag 4 bis zu einer Serumverdünnung von 1:19, am Tag 8 bis 1:35 und am Tag 12 bis 1:198. In der mit cholesterinreicher Diät gefütterten Gruppe ergeben sich die Werte 1:15 für Tag 4, 1:31 für Tag 8 und 1:151 für Tag 12, bei der nicht behandelten Kontrolle entsprechend 1:14 (Tag 4), 1:34 (Tag 8) und 1:160 (Tag 12).

1. Einleitung

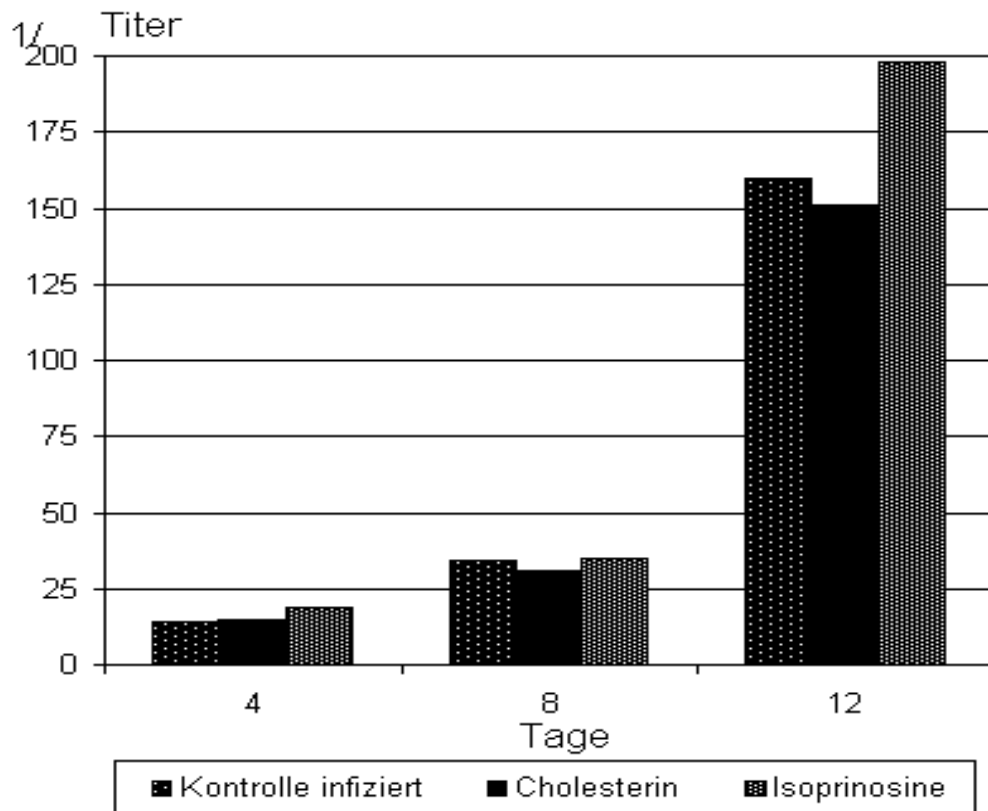


Abb. 20

: Antikörpertiter Tage 4, 8 und 12

Im Gruppenvergleich ergeben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede an den jeweiligen Tagen.

Diskussion

1.

Versuchsmodell

Das Tiermodell basiert auf Untersuchungen von MATSUMORI und KAWAI (1982). Hiernach zeigen EMC-Virus infizierte Mäuse schwere Infektionsverläufe mit histologischen, hämodynamischen und elektrokardiographischen Veränderungen am Herzen, die dem typischen Bild einer Myokarditis beim Menschen entsprechen.

Die durch Coxsackie B3-Viren hervorgerufenen Myokarditiden bei Mäusen zeigen Läsionen am Herzen erst zu einem späteren Zeitpunkt, die insgesamt schwächer ausgeprägt sind als bei EMCV-Infektionen. Auch

1. Einleitung

treten bei EMCV-Myokarditiden von Mäusen weniger Verkalkungen auf als unter Coxsackie B3-Virusinfektionen, was eher dem Bild einer Myokarditis beim Menschen entspricht (MATSUMORI 1987).

Das EMC-Virus wurde von KOCH (1950) aus Blut, Liquor und Faeces von Patienten isoliert, die keine klinischen Zeichen einer Myokarditis aufwiesen. Erhöhte Titer gegen EMC-Viren wurden 1961 von JONKERS bei gesunden Indianern in Louisiana und Peru gefunden. Nicht zuletzt wegen der fehlenden Humanpathogenität (BURCH 1973) gaben wir dem EMC-Virus den Vorzug.

NMRI-Mäuse wurden verwendet, da diese unter EMC-Virus-Inokulation eine 100%ige Infektionsrate zeigen. Zudem weisen sie einen für den Menschen typischen Verlauf der Myokarditis auf (MÜCK 1991). Sechs Wochen alte Tiere wurden gewählt, da erst nach dieser Zeit das Immunsystem voll ausgereift ist.

Ernährung der Tiere

Alle Versuchstiere erhielten Futter der Fa. SNIFF. Die orale Gabe von Isoprinosine (im Futter) im Gegensatz zur möglichen intraperitonealen Verabreichung wurde gewählt, um den Versuchstieren weitere Streßerlebnisse und Infektionsrisiken zu ersparen. Durch geeignete Dosierung im Futter, unter Berücksichtigung der Freßmenge, lagen laut Hersteller (Fa. FISIONS) die gemessenen Plasmaspiegel von Isoprinosine im oberen therapeutischen Normbereich.

Durch Verabreichung des mit Cholesterin angereicherten Futters konnte eine Erhöhung des Blutcholesterinspiegels von 130,2

$\pm 8,64$ mg/dl auf $297 \pm 11,39$ mg/dl erzielt werden. Diese Werte liegen im Bereich der laut Literatur ermittelten Serumcholesterinspiegel für Mäuse unter normaler als auch unter cholesterinreicher Fütterung. Auch hier wurde schon nach Verabreichung der Spezialdiät für nur eine Woche ein um 100% erhöhter Blutcholesterinspiegel ermittelt (CAMPBELL 1978, 1982).

Einflüsse der verschiedenen Diäten auf den Gewichtsverlauf konnten durch gleiche Gewichtszunahmen von gesunden Tieren ausgeschlossen werden (siehe 3.1.1.1.). Die unterschiedlichen Gewichtsverläufe in der Akutphase der Erkrankung sind also nicht durch hypokalorische Ernährung bedingt und lassen somit Rückschlüsse auf eine therapeutische Beeinflussung zu.

Beobachtung der Intravitalparameter

1. Einleitung

Aufgrund der individuellen Kennzeichnung der Versuchstiere und durch exakte Dokumentation der Paresen und des Gewichtsverlaufes konnte eine 100%ige Infektionsrate unter den Tieren bewiesen werden. Weiterhin waren Beginn und Verlauf der Erkrankung für jedes Tier nachvollziehbar. Eine Verfälschung des Ergebnisses durch nicht erfolgte Infektion von Tieren in einer Gruppe kann somit ausgeschlossen werden.

Interferonnachweis

Der Einfluß von Isoprinosine und Cholesterin auf die endogene Interferonproduktion bei NMRI-Mäusen nach EMCV-Infektion wird durch den 1981 von EPSTEIN standardisierten Interferonnachweis überprüft.

Durch streng steriles Arbeiten wurde einer Kontamination der Medien sowie Superinfektion der Zellkulturen vorgebeugt. Zusätzlich wurden regelmäßig die unter 2.2.9.4. genannten Sterilitätsprüfungen durchgeführt und jede Zellkultur vor Anlage einer Mikrotiterplatte speziell mittels DAPI-Nachweises auf Mykoplasmen untersucht.

In Vorversuchen fiel auf, daß unter Zugabe von murinem Serum zum Medium ein bis zu 20% höheres Zellwachstum auftrat als unter gleicher Menge FCS-Zusatz. Diese ungleichen Bedingungen hätten über ein unterschiedliches Wachstum der L-Zellen zu falschen Ergebnissen geführt. Um diesen Fehler auszugleichen, wurde in zahlreichen Versuchsreihen der Wachstumseffekt von Mäuseserum in einer Verdünnung von 10-2 mit dem von FCS in verschiedenen Konzentrationen verglichen. Annähernd gleiche Werte (Differenz im Wachstum von 1% bis 2%) ergaben sich für einen FCS-Zusatz von 6%, was im Verlauf des gesamten Versuches berücksichtigt wurde.

Die Verdünnung von 10-2 für die Testseren erwies sich als optimal, da bei höherer Konzentration der Wachstumseffekt nicht mehr ausgleichbar war. Bei niedrigerer Konzentration war der Interferongehalt zu gering, um einen zytoprotektiven Effekt auf die L-Zellen nachweisen zu können.

Um eventuell im Serum enthaltene infektiöse, das Ergebnis beeinflussende EMC-Viruspartikel zu eliminieren, wurden die Seren mit UV-Licht bestrahlt (GODNEY, GAUNTT 1986, 1987). Ein Einfluß auf die IFN-Aktivität wurde durch Vergleich einer bestrahlten und einer unbestrahlten Eichreihe ausgeschlossen.

Eine IFN-Induktion in den Zellkulturen durch die Kulturmedien (KIRCHER 1984) wurde ebenso ausgeschlossen wie eine bei gesunden Versuchstieren gelegentlich auftretende spontane IFN-Erhöhung ohne Infekt (GREISSER et al. 1985). Auch durch bloße Gabe von Isoprinosine bzw. Cholesterin ohne Infektion ließen sich keine erhöhten IFN-Titer bei den Versuchstieren ermitteln.

1. Einleitung

Durch orientierende Vorversuche wurden die zu erwartenden IFN-Serumkonzentrationen grob bestimmt und in dem Bereich von 10-2 I.E. pro ml bis 102 I.E. pro ml Interferon eine genaue Eichreihe erstellt, da ein linearer Zusammenhang zwischen %OD und I.E. Interferon zwischen 15% und 85% Vitalität besteht.

Plaquetest

Der Monolayer-Plaquetest stellt eine gut standardisierte Nachweismethode für die Infektiosität von Viren dar.

Als wichtige Voraussetzung ist die Ausbildung eines homogenen Monolayers in den Cups anzusehen, da nur so die entstandenen Läsionen eindeutig den im Probenserum enthaltenen infektiösen Einheiten zugeschrieben werden können. Um ein zuverlässiges Ergebnis zu erzielen, wurden nur Verdünnungsstufen ausgezählt, die keine überlappenden oder konfluierenden Plaques aufwiesen. Das linear dosisabhängige Auftreten der Plaques wurde anhand der Platten nachgewiesen, die eine Auszählung in zwei Verdünnungsstufen zuließen. Durch mehrfache Austestung einer Virussuspension mit bekannter Anzahl pfu pro ml in verschiedenen Verdünnungsstufen wurde die Richtigkeit der Methode überprüft.

ELISA-Test

Trotz mehrfachem Ansatz, unter Variation aller Versuchsbedingungen, konnten mit dem ELISA keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

Eine falsche Antigenkonzentration wurde bereits 1972 durch ENGVALL und PERLMANN als Hauptproblem erkannt. Als weitere Ursache kommen Verunreinigung der Antigenkonzentration durch zelluläre Fremdproteine in Frage, da sich bei morphologisch kleinen Viren wie dem EMC-Virus das Reinigen und Konzentrieren der Testlösung häufig als problematisch erweist.

Antikörpernachweis

Die Sensitivität und Spezifität des als Ersatz zum gescheiterten ELISA durchgeführten Neutralisationstestes wurde durch Kontrollansätze bewiesen. Bei Sechsfachbestimmung der Proben war eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse möglich. In Vorversuchen konnte eine unspezifische Virusneutralisation durch die Testseren ausgeschlossen und eine Spezifität der bestimmten Antikörper auf EMC-Viren bewiesen werden.

Diskussion der Ergebnisse

1.

Der Einfluß der Hypercholesterinämie auf den Krankheitsverlauf

Anhand der erhobenen Parameter läßt sich eine deutliche Verschlechterung des Krankheitsverlaufes unter Hypercholesterinämie aufzeigen. Übereinstimmend mit anderen Untersuchern hatten die Tiere am Tag 12 p.i. ein um 12% reduziertes Körpergewicht, während die infizierte Kontrollgruppe nur eine Reduktion um 8% gegenüber dem Ausgangsgewicht aufwies. Noch eindrucksvoller wird die Schwere der Erkrankung durch die früher auftretenden und massiver ausgeprägten Symptome dokumentiert. In dieser Gruppe zeigten am Tag 5 p.i. bereits 88% der Tiere Lähmungserscheinungen, ab Tag 7 p.i. war kein Tier mehr symptomfrei, während in der Kontrollgruppe und in der mit Isoprinosine therapierten Gruppe das Maximum der Symptomausprägung erst am Tag 7 p.i. lag. Auch die in den anderen Gruppen sich ab Tag 9 p.i. anhand von Gewichtszunahme und Rückgang der Paresen abzeichnende Besserung des Krankheitsbildes blieb hier aus und gipfelte in einer Letalität von 80% am Tag 12 p.i. (Kontrollgruppe 60%, Isoprinosine-Gruppe 30%). Von PEREIRA konnte sogar eine direkte Abhängigkeit der Mortalität und Letalität von der Höhe des Blutcholesterinspiegels bei mit MHV3-infizierten Mäusen (Maus-Hepatitis-Virus 3) festgestellt werden (PEREIRA 1987).

Obwohl bei der Höhe der Virustiter im Myokard keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden konnten, wies die cholesterinreich gefütterte Gruppe eine deutlich ausgeprägtere Entzündungsreaktion auf. Auch in anderen Studien wurde eine Zunahme der Nekrosezonen im Myokard unter Hypercholesterinämie beschrieben. Darüber hinaus konnte sogar eine positive Korrelation zwischen der Gewebeanreicherung mit Cholesterin und dem Grad der Entzündung festgestellt werden, wobei besonders in lipidreichen Gewebearealen eine Zunahme der Nekrosen zusehen war (CAMPBELL 1978, ILBÄCK 1990). Zu berücksichtigen ist jedoch, ob sich Nekrosen in cholesterinreichen Arealen schneller entwickeln oder ob die Nekrosezonen auch eine Lipidanreicherung im Randbereich nach sich ziehen. Für ersteres spricht die besondere "Lipotropie" des Cocksackie B3-Virus, einerseits durch erhöhte Replikation im Fettgewebe mit brauner Fettnekrose sowie durch Anreicherung in atheromatösen Plaques der Aorta, ebenfalls mit Zunahme der Nekrosen, als Synergismus zwischen einer Cocksackie B3-Infektion und einer Hypercholesterinämie beschrieben. Eine vermutete spezifische Veränderung des Virus durch Cholesterin konnte jedoch bislang nicht nachgewiesen werden (CAMPBELL 1978).

Abweichend von dieser Studie berichteten andere Untersucher von einer Reduzierung des entzündlichen Infiltrates unter Hypercholesterinämie bei gleichzeitiger Erhöhung der Virustiter. Verantwortlich hierfür wird eine allgemeine Suppression des Immunsystems unter Hypercholesterinämie gemacht, worauf aus einer Verminderung der IL 1-Spiegel sowie von spezifischen Markern für die funktionelle Aktivität des Immunsystems geschlossen wird. Der als Maß für die Makrophagen- und Monozyten-Aktivität gemessene Plasma-Neopterin-Spiegel war erniedrigt, ebenso wie die CD 25-Expression als Maß für die sekretorische Aktivität des Immunsystems und die CD 8-Konzentration als Marker der T-Zell-Äktivität (PEREIRA 1987, ALLEGRA 1992). Als ein möglicher Grund hierfür wird eine Membrananreicherung mit Cholesterin gesehen, was eine Veränderung des Verhältnisses von Cholesterin zu Phospholipiden mit daraus resultierender Verminderung der Membranfluidität nach sich zieht. Über eine gezielte Membrananreicherung mit Cholesterin durch Liposomen konnte eine direkte reversible Inhibierung der proliferativen Antwort von

1. Einleitung

Lymphozyten auf Concavalin A-Stimulation gesehen werden. Ebenso war die Phythamagglutinin-abhängige Zytotoxizität vermindert. Membrangebundenes Cholesterin ist somit als ein Regulator der lymphozytären Aktivität und Reaktivität anzusehen, denn eine direkte Stimulation durch Veränderung des Membrancholesterins konnte nicht nachgewiesen werden (DABROWSKI 1980).

Bei Untersuchungen an Cocksackie B3-infizierten Mäusen durch LORIA konnte festgestellt werden, daß ein kritischer Wert für das Verhältnis von Protein zu Cholesterin in Geweben besteht. Anhand der Phagozytose-Aktivität von Kupfferschen Sternzellen gegenüber opsonierten Schaferythrozyten konnte in der Leber ein Wert von 1:2,5 ermittelt werden. Nach Überschreiten dieses Quotienten trat eine signifikante Verminderung der Resistenz gegenüber MHV3-Infektionen sowie eine Erhöhung der Virustiter auf (CAMPBELL, LORIA 1982). In Hepatozytenkulturen von hypercholesterinämischen Mäusen konnte eine erhöhte Virusabsorption festgestellt werden, die jedoch nicht direkt von der Fluidität der Membranen durch veränderten Cholesteringehalt abhängig ist (NONNENMACHER 1994). Vielmehr konnte bei Fibroblasten eine vermehrte Penetration von Rhinoviren durch Bindung an LDL-Rezeptoren festgestellt werden. Bei down-Regulation der LDL-Rezeptoren sowie bei Fibroblasten mit LDL-Rezeptormangel wurden signifikant niedrigere intrazelluläre Rhinovirustiter gemessen. Weiterhin konnte das alpha2-macroglobulin rezeptor/LDLR-related Protein als Rhinovirusrezeptor identifiziert werden. In der verfügbaren Literatur fand sich jedoch keine Untersuchung, ob für Cocksackie-Viren ebenfalls Rezeptoren existieren, die sich in Abhängigkeit vom Cholesterinspiegel quantitativ oder strukturell verändern und somit eine vermehrte Viruspenetration ermöglichen (HOFER 1994).

Bei erhöhter Virusabsorption, was über eine erhöhte Replikation einen schnelleren Titeranstieg zur Folge hat, ist es möglich, daß aus diesem Grund das Titermaximum in der dieser Gruppe schon vor Tag 3 p.i. lag und somit nicht erfaßt wurde. Dies würde auch die Ausweitung der Nekrosezonen sowie die Zunahme des lymphatischen Infiltrates erklären. Bei Inhibition des Immunsystems in der Initialphase einer Entzündung mit daraus resultierendem Anstieg des Virustiters reagiert der Organismus im weiteren Verlauf mit einer verstärkten Entzündungsreaktion durch Zunahme des Antigens.

Durch Verwenden der kardiotropen Variante des EMC-Virus wurden übereinstimmend mit anderen Arbeiten im Myokard deutlich höhere Virustiter festgestellt als in der Milz, wobei auch die zunehmende Clearance ab Tag 5 p.i. den Literaturangaben entspricht. Eine durch CAMPBELL beschriebene signifikante Verschiebung der Viruselimination aus dem Blut sowie der Milz über Tag 7 p.i. hinaus konnte durch diese Studie nicht bestätigt werden.

Die signifikante Verminderung der Interferon-Titer (INF) gerade in der Anfangsphase einer Cocksackie B3-Infektion scheint von entscheidender Bedeutung für den weiteren Verlauf der Erkrankung zu sein. Tiere die vor Infektion mit Anti-INF

α - und Anti-INF β -Antikörpern behandelt wurden, wiesen eine gesteigerte Mortalität sowie frühere und höhere Letalität bei signifikant höheren Virustitern auf. Zwar wurden im weiteren Verlauf durch die höheren Virustiter auch absolut höhere Interferontiter gemessen als bei einer nicht mit Anti-INF-Antikörpern behandelten Gruppe, doch hatte diese spätere Interferonerhöhung keinen Einfluß mehr auf den Krankheitsverlauf, da bereits virusbedingte Schäden in den Zielorganen vorlagen (DIANZANI 1991). Durch Gabe von INF- β auf mit Cocksackie B3 infizierte Myokardzellkulturen konnte die protektive Wirkung in der Frühphase der Infektion bestätigt werden. Während bei regelmäßiger Erneuerung des Mediums mit INF- β die Kontraktilität der Myokardzellen erhalten blieb, war eine kontinuierliche Abnahme des Schutzeffektes zu verzeichnen, je früher die Infektion vor Gabe des Interferons erfolgte (KIRSCHNER 1988).

1. Einleitung

Die Wirksamkeit des Interferon-Systems wird über viele Faktoren beeinflusst, wobei eine Inhibition vor allem der INF-

β -Wirksamkeit durch Kortison nachgewiesen werden konnte. Peritoneal-Makrophagen verloren den antiviralen Status gegenüber EMC-Viren bei Vorbehandlung mit Kortison und selbst hochdosierte INF- β -Gaben zeigten unter Zugabe von Prednisolon keine Schutzwirkung auf Myokardkulturen nach Infektion mit Coxsackie B3 (BELARDELLI 1984, KIRSCHNER 1988, DIANZANI 1991). Durch Untersuchungen an Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie konnten jedoch keine Unterschiede der Kortisol-Basalspiegel sowie der Spiegel nach Stimulation mit ACTH gegenüber einem gesunden Kollektiv festgestellt werden, so daß eine Beeinträchtigung hierdurch ausscheidet (BOIZEL 1986). Vielmehr scheint eine Hypercholesterinämie spezifische reversible Veränderungen an Interferon-Rezeptoren zu bewirken. Einerseits konnte bei Hypercholesterinämie durch die endogenen Interferon-Spiegel als auch durch Interferontherapie kein antiviraler Status erzeugt werden und auch die Ansprechbarkeit von Makrophagen durch Interferon war hierunter deutlich vermindert. Nach Normalisierung der Cholesterinspiegel war wieder eine normale Infektanfälligkeit zu verzeichnen (PEREIRA 1987, BRAUNWALD 1991).

Durch die Titerbewegung der Antikörper konnte nochmals der Nachweis einer frischen Infektion bei allen Tieren erbracht werden. Übereinstimmend mit anderen Arbeiten konnte hier kein Einfluß einer Hypercholesterinämie auf die Antikörperproduktion nachgewiesen werden. Obwohl in anderen Studien erniedrigte Antikörpertiter nach Coxsackie B3- und B5-Infektionen gesehen wurden, war eine normale B-Lymphozyten-Blastogenese bei Hypercholesterinämie zu verzeichnen. Die Ursache hierfür könnte in einer schlechteren Antigen-Präsentation durch behinderte Makrophagen-Aktivität sowie in einer Verminderung der Interleukin-Produktion liegen (KOS 1979).

Der Einfluß einer Therapie mit Isoprinosine auf den Infektionsverlauf

Im Gegensatz zur beobachteten Verschlechterung des Infektionsverlaufs durch Hypercholesterinämie ließ sich bei Therapie mit Isoprinosine eine deutliche Verbesserung feststellen. Neben der unter Infektion erzielten Gewichtszunahme von über 10% traten auch die Paresen weniger ausgeprägt auf. Der Beginn der Symptomatik wurde um zwei Tage verzögert und auch die Persistenz der überwiegend nur einseitigen Paresen war geringer als in den anderen beiden Gruppen. Besonders wurde der Einfluß von Isoprinosine auf den Infektionsverlauf durch die Letalität von nur 30% verdeutlicht. Diese Ergebnisse korrelieren mit den zahlreichen Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen zur Beeinflussung der Intravitalparameter unter Isoprinosine-Therapie (GLASKY 1972, WALDMANN 1977, LAUDENBACH 1984, DIANZANI 1991).

An Tag 4 und Tag 8 wurden signifikant erhöhte Interferontiter bestimmt. Messergebnisse vor Tag 4 liegen in dieser Studie nicht vor, doch ist die Bedeutung von Interferon im Anfangsstadium der Infektion bekannt. Die verminderten myokardialen Schäden bei geringerem entzündlichen Infiltrat lassen somit auch auf eine Erhöhung der Interferontiter in der Frühphase schließen. Auch hier belegen mehrere Studien die Ergebnisse (GLASKY 1977, FORMINA 1980). Bei in vitro Versuchen an Myokardzellkulturen konnte gezeigt werden, daß nur eine möglichst frühe Anwesenheit von Interferon den Infektionsverlauf signifikant beeinflussen kann. Ein maximaler Schutz konnte bei einer Interferongabe 2-4 Stunden vor Infektion gesehen werden. Deutlich geringer war dieser ausgeprägt nach Penetration der Viren und kein Effekt war mehr nachweisbar bei Gabe von Interferon nach Beginn der Virusreplikation. Als Folge war nach 9 Stunden keine Kontraktion mehr nachweisbar, nach 20 Stunden traten Myolysen auf und nach 5 Tagen war ein Überwachsen mit Fibroblasten zu verzeichnen. Bei Gabe von 100-300 IE/ml Interferon vor Infektion waren die Kontraktionen noch nach 6 Tagen rhythmisch und auch die Nekrosen deutlich geringer. Als Nebeneffekt war eine dosisabhängige Steigerung der Schlagfrequenz zu verzeichnen. Dieser Effekt trat deutlich jedoch erst jenseits der

1. Einleitung

therapeutisch erreichbaren Plasmaspiegel von etwa 300 IE/ml auf. Bei einer Höhe von bis zu 1000 IE/ml konnte eine Zunahme der Schlagfrequenz trotz Infektion um bis zu 50% nachgewiesen werden, während unter Zusatz von INF-Antiserum diese noradrenalinähnliche Stimulation ausblieb. Inwieweit jedoch diesem Effekt gerade bei myokardialen Infektionen neben der antiviralen Aktivität eine weitere wichtige Rolle zukommt, ist schwer zu beurteilen, da in endogenen und therapeutischen Dosisbereichen eine messbare Beeinflussung der Herzfunktionen bisher nicht festgestellt werden konnte (KANDOLF 1985, 1987).

Neben der Erhöhung der Interferon-Produktion durch Isoprinosine wirkte sich auch die Steigerung der antiviralen Potenz von Interferon auf den Infektionsverlauf aus. Bei gleichen Interferon-Spiegeln konnte durch Verabreichung von Isoprinosine noch nach Penetration der Viren eine Wirkungsverstärkung nachgewiesen werden. Eine Steigerung der Interferon-Wirkung um den Faktor 8 bis 16 konnte erreicht werden, wenn die Isoprinosine-Gabe 18 Stunden vor Infektion erfolgte (MUNOZ 1986).

Ohne den Mechanismus dieser Wirkungsverstärkung erklären zu können, ist hier eine wesentliche Voraussetzung für das signifikant bessere Abschneiden der mit Isoprinosine therapierten Tiere zu vermuten.

Erklärungen für diesen und auch andere Effekte könnten im Vergleich der Wirkung mit Mediatoren des Immunsystems zu finden sein. Neben Übereinstimmungen in der Wirkungsweise mit den Thymushormonen Thymopoietin, Thymosin alpha 1 und Thymolin ist bei Isoprinosine ein ähnliches Wirkprofil wie bei dem Transfer Faktor bekannt. Hierbei handelt es sich um eine aus T-Lymphozyten dialysierbare Substanz, die ebenfalls wie Isoprinosine als wichtigen Baustein Inosin enthält. Bisher liegen jedoch nur vereinzelt Ergebnisse über den Einsatz bei viralen und bakteriellen Infekten vor, die nicht standardisiert sind. Auch konnte die Theorie, daß Isoprinosine die gleichen Rezeptoren benutzt wie der Transfer Faktor bisher nicht bestätigt werden (HADDEN 1991). Wie hieraus jedoch ersichtlich, scheint Isoprinosine eine sehr viel komplexere Rolle im Immunsystem zu spielen als zunächst angenommen, so daß bei der Bewertung der gewonnenen Daten Probleme durch unbekannte Einflußgrößen entstehen können.

Besonders auffällig stellen sich die gemessenen Virustiter in Bezug auf die gesehenen Infiltrate und myokardialen Schäden dar. Während sich zwischen Tag 3 und Tag 6 bei den Virustitern im Myokard keine signifikanten Unterschiede ergaben, waren die Infiltrate in der mit Isoprinosine therapierten Gruppe deutlich verringert. Eine unspezifische antiinflammatorische Wirkung von Isoprinosine, insbesondere des Acetamidobenzoessäure-Restes, scheidet als Ursache aus, da bei Therapieversuchen mit Salicylaten und Indometazin eine signifikante Erhöhung der Virustiter im Myokard sowie eine massivere Ausprägung der Myokarditis gesehen wurde (GOODWIN 1983, REZKALLA 1986).

Entsprechende Ergebnisse zu den in dieser Studie gewonnenen Daten fanden sich unter Interferon-Therapie 24 Stunden vor bis 24 Stunden nach Infektion. Auch hierunter wurde eine deutliche Reduktion der Infiltrate bei gleichen Virustitern festgestellt. Als Ursache dafür wird eine erhöhte Aktivität von NK-Zellen in der frühen Infektionsphase angesehen. Diese Zellen erscheinen mit einem Maximum an Tag 3 p.i. als eine der ersten zellulären Abwehrreaktionen des Organismus auf virale Infekte, sind jedoch an dem Entstehen von myokardialen Läsionen nicht beteiligt. Diese werden in erster Linie den ab Tag 5 einwandernden spezifischen zytotoxischen T-Zellen zugeschrieben. Als mögliche Ursache käme somit ein verändertes Verhältnis zu Gunsten der NK-Zellen gegenüber den zytotoxischen T-Zellen in der Viruselimination in Betracht, wodurch myokardiale Schäden vermieden würden (LUTTON, GAUNTT 1985). Diese These wird durch

1. Einleitung

Untersuchungen unterstützt, wonach Isoprinosine zunächst eine unspezifische Stimulation der undifferenzierten Stammzellen und danach eine Differenzierung entsprechend dem physiologischen Erscheinen der Zellen bewirkt. Dadurch stehen die die Virusreplikation limitierenden NK-Zellen als erstes Produkt der Stammzelldifferenzierung gerade in der Initialphase der Infektion vermehrt zur Verfügung. Umgekehrt konnte durch Behinderung der NK-Zell-Aktivität durch Zusatz eines Antiserums eine schwerere Myokarditis erzeugt werden. Ab Tag 8 war eine deutliche Zunahme der Läsionen sowie der dystrophen Kalzifizierung im Myokard zu verzeichnen. Die Virus-, Interferon- oder Antikörpertiter wiesen jedoch keine signifikanten Abweichungen auf (GODENY 1987). Die unter Isoprinosine-Therapie erzielte signifikante Reduzierung der Virustiter im lymphatischen Gewebe mit einem Maximum am Tag 2 bis Tag 3 und einer anschließenden Persistenz für 4 bis 6 Tage auf deutlich niedrigerem Niveau entspricht den Literaturangaben (CAMPOLI-RICHARDS 1986).

Bezüglich der Antikörper-Produktion konnten weder im zeitlichen Verlauf noch in der Titerhöhe am Tag 12 Unterschiede zu den anderen Gruppen festgestellt werden. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Untersucher, die an diesem Versuchsmodell weder durch Interferon- noch durch Isoprinosine-Therapie signifikante Veränderungen der Antikörperantwort feststellen konnten (CHANY, CERUTTI 1977, LUTTON, GAUNTT 1985). Lediglich bei Influenza-Infektion konnten unter Isoprinosine-Therapie bei Mäusen erhöhte Titer der Anti-Hämagglutinin- und Anti-Neuraminidase-Antikörper festgestellt werden (ONISHI 1983).

Schlußbetrachtung

Die vorliegenden Ergebnisse der Untersuchung zeigen eine Beeinflussung der Initialphase einer virusinduzierten Myokarditis durch Isoprinosine sowie alimentärer Hypercholesterinämie.

Aufgrund dieser Erkenntnisse scheint eine prophylaktische Gabe von Isoprinosine bei der Verdachtsdiagnose einer Virusmyokarditis als sinnvoll, nicht zuletzt wegen fehlender Kontraindikationen. Jedoch ist der in diesem Tiermodell gewählte Behandlungsbeginn mit Isoprinosine in praxi nicht durchführbar und es bedarf weiterer Versuche um zu klären, inwieweit noch positive Effekte zu erzielen sind, wenn die Gabe von Isoprinosine erst nach Auftreten von ersten klinischen Symptomen erfolgt, ebenso wie die Wirksamkeit im subakuten oder chronischen Stadium. Von besonderem Interesse erscheint weiterhin die Frage, ob unter Einsatz von Isoprinosine in der Initialphase der Entzündung der Übergang in eine dilatative Kardiomyopathie verhindert werden kann. Hinweise bezüglich dieser Fragestellung könnten durch Langzeitversuche mit unterschiedlichem Therapiebeginn gewonnen werden. Da zur Therapie der subakut sklerosierenden Panenzephalitis mit Isoprinosine je nach Stadium unterschiedliche Therapieschemata bestehen, sind auch hier weitere Versuche indiziert, die Aufschlüsse darüber bringen, ob eine Dauertherapie oder eine Intervalltherapie mit jeweils individuellen Dosierungen zu bevorzugen ist.

Während es im Rahmen eines alimentären Selenmangels bei der Keshar-Krankheit zu einer gesteigerten Pathogenität von Coxsackie-Viren durch verminderten Radikalabbau kommt, finden sich in der verfügbaren Literatur zwar Untersuchungen über den Einfluß von Oxidantien unter Hypercholesterinämie auf das Endothel der Gefäßwände, nicht aber auf einen Infektionsverlauf (ARAUJO 1995, BLANN 1995, AVIRAM 1996). Weiterhin wäre es von Interesse, in wieweit durch eine Senkung des Cholesterinspiegels unter Infektion noch Einfluß auf den Verlauf und die Prognose der Erkrankung genommen werden kann.

1. Einleitung

In beiden Fällen stellte sich die Höhe des Interferonspiegels in der Frühphase der Infektion als einer der entscheidenden Parameter für den weiteren Verlauf der Erkrankung dar. Um diesen Einfluß noch besser verifizieren zu können, sollten die Interferontiter unmittelbar nach Infektion bis 30 Stunden p.i. engmaschig bestimmt werden, da in diesem Zeitraum die Titermaxima zu erwarten sind (DE SIMONE 1985). Die Messintervalle dieser Studie erscheinen im nachhinein als zu groß und etwas zu spät gewählt.

Den unter Isoprinosinetherapie beobachteten verminderten myokardialen Infiltraten und Gewebeschäden sollten in weiteren Versuchen Beachtung geschenkt werden. So besteht die Möglichkeit über immunhistochemische Untersuchungen des Myokards Erkenntnisse über die Zusammensetzung des Infiltrates zu gewinnen um zu sehen, ob die Stimulation der NK-Zellen durch Isoprinosine hierfür verantwortlich ist. Über diesen Mechanismus wäre eine gezielte Einflußnahme auf die Akutphase der Erkrankung, sicherlich auch mit Verbesserung der Prognose denkbar.

Zusammenfassung

Zur Therapie der Virusmyokarditis existieren zur Zeit nur palliative Therapiekonzepte. Eine ätiologiespezifische Behandlung in der Akutphase ist nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die in zahlreichen Studien gemachten Beobachtungen der Beeinflussbarkeit einer viralen Infektion in der Frühphase durch Isoprinosine sowie alimentärer Hypercholesterinämie auf die virusinduzierte Myokarditis zu übertragen. Ziel dieser Studie war es, die an unterschiedlichen Tiermodellen erhobenen, teilweise widersprüchlichen Daten durch standardisierte Versuchsbedingungen zu überprüfen und anhand virologischer und immunologischer Parameter eine mögliche Erklärung zu finden.

Einem etablierten Tiermodell zufolge wurden sechs Wochen alte männliche NMRI-Mäuse mit dem Enzephalomyokarditisvirus infiziert. Neben einer unbehandelten Kontrollgruppe wurden Tiere ab Infektionstag mit 250 mg/kgKG Isoprinosine therapiert. Bei einer weiteren Gruppe wurde durch cholesterinreiche Kost der Blutcholesterinspiegel vor Infektion und auch in der Akutphase gegenüber den anderen um über 100% erhöht. Alle Tiere wurden bis Tag 12 post infektionem untersucht. Intravital zeigte sich in der mit Isoprinosine therapierten Gruppe ein deutlich milderer Infektionsverlauf. Neben einer geringeren Sterberate waren diese Tiere auch signifikant schwerer als die Kontrollen. Die am Tag 12 erhobenen histopathologischen Befunde des Myokards korrelierten mit dem bereits intravital gesehenen schwächeren Krankheitsgeschehen. Neben dieser positiven Beeinflussung wurde in der hypercholesterinämischen Gruppe eine wesentliche Verschlechterung des Verlaufs festgestellt. Auch hier war eine Übereinstimmung der Ergebnisse bezüglich des Gewichtsverlusts, der Schwere des Krankheitsverlaufs, der Sterberate und des Organbefunds zu verzeichnen.

1. Einleitung

Bei der Interferonbestimmung wurden für die Isoprinosinegruppe am Tag 4 und Tag 8 signifikant erhöhte Serumspiegel festgestellt. Am Tag 4 war der Interferonspiegel der Cholesteringruppe gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt. Am Tag 12 war mit dieser Methode in allen Gruppen kein Interferon mehr nachweisbar. Bezüglich der Virustiter ergaben sich im Myokard für alle Gruppen annähernd gleiche Werte mit einem Maximum am Tag 4. Im Milzgewebe war in der Isoprinosinegruppe der Virustiter an allen Tagen signifikant erniedrigt. Die Bestimmung der Antikörper zeigte bei typischem Verlauf für eine Erstinfektion keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Unter Zuhilfenahme der verfügbaren Literatur konnte sowohl der günstige Einfluß von Isoprinosine als auch die negative Beeinflussung einer Hypercholesterinämie auf die Frühphase der Infektion teilweise geklärt werden. Durch weiterführende Versuche, zu denen diese Arbeit anregen könnte, wäre eine differenziertere Beantwortung der Fragestellung zu erwarten.

Literatur

Allegra-A, Corica-F

"The influence of hypercholesterolemia on some aspects of immune pattern in elderly"

Arch. Gerontol. Geriatr. 15 (1992) 13-19

Andre-P, Travo-P, Stoclet-JC, Poindron-P

"Mechanical response of rat vascular smooth muscle cells to rat interferon"

J-Interferon-Res. 6 (4): 397-404 (1986)

Araujo-FB, Abdalla-BSD

"Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia"

Atherosclerosis 117/1:61-71, (1995)

Aretz-HT, Billingham-ME, Edwardsd-WD

"Myocarditis: a histopathologic definition and classification"

Am. J. Cardiovasc. Pathol. (1987) 1:3-14

1. Einleitung

Aspetov-RD, Novokhatskii-A, Nosik-D, Burshtein-E et al.

"Human immune interferon: production and action"

Vopr-Virusol. 29 (2): 240-245 (1984)

Aviram-M

"Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in athrosclerosis and the antiatherogenicity of antioxidants"

Europ. J. Clin. Chem. and Clin. Biochem. 34/8:599-608, (1996)

Baron-S, Buckler-CE, Mc Closkey-R, Kirschstein-RL

"Role of interferon during viremia: I) Production of circulating interferon"

J-Immunol. 96: 12-16 (1966)

Baron-S, Buckler-CE, Friedman-R, Mc Closkey-R

"Role of interferon during viremia: II) Potective action of circulating interferon"

J-Immunol. 96: 17-24 (1966)

Belardelli-F, Vignaux-F

"Infection of mice with antibody to interferon "

Proc. Natl. Acad. Sci. 81:602-606, (1984)

Betts-RF

"Isoprinosine in experimental influenza"

78th Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol., Las Vegas 1978

Biron-CA, Young-HA, Kasaian-MT

"Interleukin 2 induced proliferation of murine natural killer cells in vivo"

1. Einleitung

J-Exp-Med. 171 (1): 173-188 (1990)

Blann-AD, Maxwell-SRJ

"Antioxidants and endothelial cell injury in hypercholesterolemia and vascular disease"

Atherosclerosis 116/2:191-198, (1995)

Bridgen-W

"Uncommon myocardial diseases- the noncoronary cardiomyopathies"

Lancet 2: 1243-1249 (1957)

Bolte-HD, Ludwig-B, Schultheiss-HP

"Virusmyokarditis: Symptomatologie, Klinische Diagnostik und
Hämodynamik"

Internist (1984) 25:143-149

Bolte-HD, Schultheiss-HP, Ludwig-B, Cyran-J

"Immunologische Untersuchungsbefunde an Myokardbiopsien von Patienten mit Kardiomyopathien"

Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforsch. (1977) 43:352-354

Boizel-R

"Pattern of plasma levels of cortisol in normal subjects and in patients with homozygous familial hypercholesterolemia during ACTH infusion"

Clin. Endocrinology 25 (4):363-371, (1986)

Bonin-O

"Quantitative virologische Methodik"

G. Thieme- Verlag, Stuttgart (1973)

1. Einleitung

Braunwald-J, Nonnenmacher-H

"Increased susceptibility to mouse hepatitis virus type 3 infection induced by a hypercholesterolemic diet with increased adsorption of MHV3 to primary hepatocyte cultures"

Res. Virol. 142:5-15 (1991)

Buge-AG

"Isoprinosine in treatment of acute viral encephalitis"

Lancet II, 691 (1979)

Burch-GE, Harb-JM

"Encephalomyocarditis (EMC) virus infection of the mouse aorta"

Am. Heart J. (1973) 86:669-675

Cambridge-G, Macarthur-CGC, Waterson-AP, Goodwin-FOakley-CM

"Coxsackie B virus in congestive cardiomyopathy"

Br. Heart J. (1979) 41:692-696

Campbell-AE, Loria-RM

"Coxsackievirus B cardiopathy and angiopathy in the hypercholesterolemic host"

Atherosclerosis, 31 (1978) 295-306

Campbell-AE, Loria-RM

Dietary hepatic cholesterol elevation: effects on coxsackievirus B infection and inflammation"

Infection and Immunity 37, (1982) 307-317

Campoli-Richards-DM

Inosine Pranobex - a preliminary review on its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy"

1. Einleitung

Drugs 32, 383-424 (1986)

Cao-Y, Schnurr-DP, Schmidt-NJ

"Differing cardiotropic and myocarditic properties of group B type 4 coxsackievirus strains"

Arch-Virol. 80 (2-3): 119-130 (1984)

Casals-J

"Immunological techniques for animal viruses"

Methods-Virol. 3: 113-198 (1967)

Chang-TW

"Antiviral activity of isoprinosine in vitro and in vivo"

Am. J. of Sciences 265: 143-146 (1973)

Chassin-MR, Bruger-M

"Effect of induced hypercholesterolemia on antibody respons in rabbits"

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 42:457, (1939)

Committee

Am-J-Public-Health. 47: 1556 (1957)

Connell'O-JB

"Immunosuppression for dilated cardiomyopathy"

N. Engl. Med. (1989) 321:1119-1121

Cooper-PD

"The plaque assay of animal viruses"

1. Einleitung

Methods-Virol. 3: 243-311 (1967)

Dabrowski-MP, Peel-WE

"Plasma membrane cholesterol regulates human lymphocyte funktion"

Eur. J. Immunol. 10: 821 ff (1980)

Daly-K, Richardson-PJ, Olsen-EGJ, Pattison-J,G, Jewitt-D

"Immunosuppressive therapy in acute inflammatory myocarditis"

Brit. Heart J. (1982) 48:94-97

Das-SK, Cassidy-JT

"Antiheart antibodies in cardiomyopathy"

in: Kawai-C, Abelmann-WH (eds.)

"Cardiomyopathy update I: Pathogenesis of myocarditis and cardiomyopathy"

University of Tokyo Press: 269-275 (1988)

Dec-GW, Palacios-J, Fallon-JT, Aretz-HT, Mills-J et al.

"Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies"

N-Engl-J-Med. 312 (14): 885-891 (1985)

De Simone-C

"Influence of methisoprinoön kinetics of immune interferon production and blastogenesis"

Immunopharmacology 7:317, (1985)

Dewey-K, Nuzum-F

"Effect of cholesterol on phagozytosis"

J. Infekt. Diseases 15:472, (1914)

1. Einleitung

Dianzani-F, Capobianchi-MR, Matteucci-D, Bendinelli-M

"The role of interferon in picornavirus infections"

N.b.: 65-80 (1988)

Dianzani-F, Monahan-TM, Santiano-M

"Membrane alteration responsible for the induction of gamma interferon"

Infect-Immun. 36: 915-917 (1982)

Dubois-MF, Hovanessian-AG

"Modified subcellular localization of interferon induced p68 kinase during encephalomyocarditis virus infection"

Virology 179: 591-598 (1990)

Dugas-B, Vazquez-A, Klein-B, Delfraissy-JF et al.

"Early events in human B cell activation: metabolic pathways vary according to the first signal used"

Eur-J-Immunol. 16 (12): 1609-1614 (1986)

Dulbecco-R

Proc-Natl-Acad-Sci-U-S 38: 747 (1952)

Eckstein-R., Mempel-M, Bolte-HD

"Reduced suppressor cell activity in congestive cardiomyopathy and myocarditis"

Circulation (1982) 65:1224-1229

Eggers-HJ, Bültmann

"Virus und Herz"

1. Einleitung

Verh. Dtsch. Ges. Path. (1981) 65:127-132

Engvall-E, Perlmann-P

"Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G"

Immunochemistry 8: 871-874 (1971)

Engvall-E, Perlmann-P

"Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) III. Quantitation of specific antibodies of enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes"

J-Immunol. 109: 129-135 (1972)

Engvall-E

"Quantitative enzyme immunoassay in microbiology"

Med-Biol. 55: 193-200 (1977)

Epstein-LB

"Mitogen and antigen induction of interferon in vitro and in vivo"

Tex-Rep-Biol-Med. 35: 43-56 (1978)

Epstein-LB, Mc Manus-N, Hebert-S. Woods-Hellman-J et al.

"Microtiter assay for antiviral effects of human and murine interferon utilizing a vertical light path photometer for quantitation"

in: "Methods for studying mononuclear phagocytes"

Acad-Press New York: 619-628 (1981)

Fohlmann-J, Friman-G, Ilback-NG, Akesson-A, Huber-S

"A qualitative and quantitative method for in situ characterization of the inflammatory response in experimental myocarditis"

APMIS 98 (6): 559-567 (1990)

1. Einleitung

Formina-AN, Grigorian-SS

"Combined use of isoprinosine and an interferon inducer in experimental viral infection"

Antibiotiki 25: 854-856, (1980)

Gauntt-CJ, Godney-EK, Lutton-CW

"Host factors regulating viral clearance"

Pathol-Immunopathol-Res. 7 (4): 251-265 (1988)

Gessner-A, Moskophidis-D, Lehmann-Grube-F

"Enumeration of single IFN gamma producing cells in mice during viral and bacterial infection"

J-Immunol. 142 (4): 1293-1298 (1989)

Ginsberg-T

"Urinary excretion of purine metabolites"

5th Int. Congress of Pharmacology San Francisco 1974

Ginsberg-T, Glasky-AJ

"Inosiplex: an immunomodulation model for the treatment of viral disease"

Annals of the N.Y. Acad. of Science 284:128-138, (1977)

Godney-EK, Gauntt-CJ

"Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3 induced murine myocarditis"

J-Immunol. 137: 1695-1702 (1986)

Goodwin-JS, Ceuppens-JL

"Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on immune function"

1. Einleitung

Semin. Arthritis Rheum. 13:134-143, (1983)

Gorden-P, Majde-JA

"Down-regulation of immunological inflammation by immunomodulatory agents"

Int. J. of Immunopharmacology 4:311, (1982)

Gore-I, Saphir-O

"Myocarditis. A classification of 1402 cases"

Am-Heart-J. 34: 827-830 (1947)

Gresser-I, Belardelli-F, Vignaux-F, Maury-C, Tovey-MG

"Role of endogenous spontaneous interferon in mice"

in: Kirchner-H, Schellekens-H (eds.)

"The biology of interferon system 1984"

Elsevier Science Publishers B.V.: 157-160 (1985)

Gresser-I, Bourali-C, Thomas-MT, Falcoff-E

"Effect of repeated inoculation of interferon preparations on infection of mice with encephalomyocarditis virus"

Proc-Sco-Exp-Biol-Med. 127: 491-496 (1968)

Grist-NR, Ross-C, Bell-E, Stott-EJ

"Diagnostic methods in clinical virology"

Blackwell Scientific Publications Oxford (1966)

Gross-R, Schölmerich-P

"Lehrbuch der Inneren Medizin"

Schattauer Stuttgart, New York 6.Auflage (1982)

1. Einleitung

Hadden-JW, Lopez-C

"Levamisole and inosiplex: antiviral agents with immunopotentiating action"

Annals of the N.Y. Acad. of Sciences 284:139-152, (1977)

Hadden-JW

"Immunopharmacology and immunotoxicology "

Advances in experimental medicine and biology 288:1-11, (1991)

Hermann-EC, Gabliskis-J, Engle-C, Perlmann-P

"Agar diffusion method for detection and bioassay of antiviral antibiotics"

Proc-Sco-Exp-Biol-Med. 103: 625-628 (1960)

Hersey-P, Bindon-C

"Effect of isoprinosin on interleukin 1 and 2 production and on suppressor cell activity"

Int. J. of Immunopharmacology 6:321-328, (1984)

Herzum-M, Maisch-B

"Antiviral and antimyocyte antibodies in experimental myocarditis"

Springer-Semin-Immunopathol. 11: 69-71 (1989)

Hofer-F, Grünberger-M

"Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus"

Proceedings of the Nat. Acad. Scien. U.S.A. 91 (5):1839-42, (1994)

Hopf-R, Kunkel-B, Sievert-H

"Kardiomyopathien"

1. Einleitung

in: "Aktuelles Wissen Hoechst" (1990)

Huber-SA, Lyden-DC, Lodge-PA

"Myokarditis"

in: Herz 10 (1885) Urban und Schwarzenberg S.1-7

Ilbäck-NG

"Cardiovascular lipid accumulation with coxsackie B virus infection in mice"

Am. Journal of Path. 136, (1990) 159-166

Jones-CE

"Inosiplex therapy in subacute sclerosing panencephalitis"

Lancet I, 1034-1036 (1982)

Jungeblut-GW

"Columbia SK-group of virusus"

in: Doerr-R, Hallauer-C (eds.)

"Handbuch der Virusforschung", Band 4

Springer Verlag, Wien (1958)

Kalden-JR

"What is inflammation?"

Eur-Heart-J. 8 (Suppl.J.): 1-5 (1987)

Kaltenbach-R

"Virale Herzerkrankungen: Prognostische Konsequenzen"

1. Einleitung

in Schader, Fortschritte der Medizin, Springer 1986

Kandolf-R

"Coxsackie B3 virus can replikate in cultured human foetal heart cells and is inhibited by interferon"

J. of Molecular and Cellular Cardiology (1985) 17:167-181

Kawai-C, Matsumori-A, Kumagai-N, Tokuda-M

"Experimental coxsackie-virus B3 and B4-myocarditis in mice"

Jpn. Circ. J. (1978) 42:43-47

Kawai-C, Matsumori-A, Kitauro-Y, Takatsu-T

"Viruses and the heart: viral myocarditis and cardiomyopathy"

Prog. Cardiol. (1978) 7:141-162

Kereiakes-DJ, Parmley-WW

"Myocarditis and cardiomyopathy"

Am Heart J. (1984) 108:1318-1326

Khatib-R, Khatib-G, Chason-JL, Lerner-AM

"Alterations in coxsackie B4 heart muscle disease in ICR swiss mice"

J-Gen-Virol. 64: 231 ff. (1983)

Kirchner-H

"Interferons. A group of multiple lymphokines"

Springer-Semi-Immunopathol. 7: 347-374 (1984)

Kishimoto-C, Abelman-WH

1. Einleitung

"Monoclonal antibody therapy for prevention of acute coxsackievirus B3 myocarditis in mice"

Circulation 79 (6): 1300-1308 (1989)

Kishimoto-C, Tomoika-N, Kawai-C

"Clinical findings in acute viral myocarditis"

in: "Herz" Urban & Schwarzenberg München, Wien,

Baltimore 10 (1): 15-20 (1985)

Klavinski-LS, Geckeler-R, Oldstone-MB

"Cytotoxic T-lymphocyte control of acute lymphocytic choriomeningitis virus infection: interferon gamma but not human necrosis factor alpha displays antiviral activity in vivo"

J-Gen-Virol. 70 (Pt 12): 3317-3325 (1989)

Kos-WL, Loria-RM

"Inhibition of host resistance by nutritional hypercholesteremia"

Infection and Immunity, 26: 658-667, (1979)

Laudenbach-P

"Therapeutic efficacy of isoprinosine in treatment of oral herpes"

Report by Newport Pharmaceuticals Int. 1984

Levi-G, Scalvini-S, Volterrani-M, Marangoni-S et al.

"Coxsackie virus heart disease: 15 years after"

Eur-Heart-J. 9 (12): 1303- 1307 (1988)

Lodge-PA

"Coxsackievirus B3 Myocarditis, acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms"

1. Einleitung

Am. J. of Path. (1987) 128:455-463

Lohr-M, Slenczka-W

"Early myocardial lesions in mice with EMC-virus myocarditis"

European Heart J.(1986) 7:411-417

Lörcher-K

"NMRI- Mäuse, Herkunft und Zucht"

Zentr. Institut für Versuchstierzucht Hannover, Brief (1990)

Lorenz-RJ

" Zur Statistik des Plaquetests"

Arch-Virusforsch. 12: 102 ff. (1962)

Loria-RM, Kibrik-S

"Infection of hypercholesterolemik mice with coxsackievirus B"

J. Infekt. Dis. (1976) 133: 655-662

Lutton-CW, Gauntt-C

"Ameliorating effect of IFN beta and anti- IFN beta on coxsackievirus B3- induced myocarditis in mice"

J- Interferon-Res. 5 (1): 137-146 (1985)

Lydtin-H, Trenkwalder-P

"Calcium-Antagonisten, eine kritische Analyse"

Springer Verlag, 1988

1. Einleitung

Maisch-B

"Immunologic regulator and effector functions in perimyocarditis,
postmyocaritic heartmusle disease and dilated cardiomyopathy"

Basic Research in Cardiol (1986) 81:217-241

Maisch-B

"Autoreaktivity to the cardiac myocyte, connective tissue and the extracellular matrix in heart diseases and postcardiac injury"

Springer-Semin-Immunopathol. 11: 369- 395 (1989)

Maisch-B

"Immune regulation, humoral and cell- mediated immune reacziions in myocarditis and dilated cardiomyopathy"

in: Kawai-C, Abelmann_WH (eds.) "Cardiomyopathy update

1: Pathogenesis of myocarditis and cardiomyopathy"

University of Tokyo Press: 245-267 (1988)

Matsumori-A, Crumpacker-CS, Abelmann-WH, Kawai-C

"Virus vaccine and passive immunization for the prevention of viral myocarditis in mice"

Jpn-Circ-J. 51 (12): 1362-1364 (1987)

Matsumori-A, Kawai-C

"Experimental animal models of viral myocarditis"

Eur-Heart-J. 8 (Suppl.J): 383-388 (1987)

Matsumori-A, Kawai-C

"An experimental model for congestive heart failure following encephalomyocarditis virus myocarditis in mice"

Circulation 65: 1230-1235 (1982)

1. Einleitung

Matsumori-A, Kawai-C

"Animal model of congestive cardiomyopathy"

Circulation (1982) 66:1349-1350

Matsumori-A, Abelmann-WH

"Treatment of viral myocarditis with ribavirin in an animal preparation"

Circulation (1985) 71:834-839

Morin-A

"Activation mechanisms of human lymphocytes by isoprinosine"

J.of Immunopharmacology 4:286, (1982)

Mosmann-T

"Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays"

J-Immunol-Meth. 65: 5563 ff. (1983)

Mosmann-T, Coffman-RL

"Two types of mouse helper cell clone. Implications of immune regulation"

Immunol-Today 8: 223 ff. (1987)

Mück-D

"Langzeitstudien zur Untersuchung der therapeutischen Beeinflußbarkeit der postmyokarditischen Kardiomyopathie bei Mäusen durch Calcium-Antagonisten"

Dissertation, Marburg 1991

Müller-WEG

"Antiviral agents and viral diseases of man"

1. Einleitung

in Gallaso (ed.), Raven Press N.Y. 1979

Munoz-A, Garcia-RA

"Potentiation by levamisole and adenine of the inhibitory activity of human interferon against EMC virus"

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 30(1), 192-195 (1986)

Mutschler-E

"Arzneimittelwirkung- Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie"

Wissensch. Verlagsges. Stuttgart (5.) 447-450 (1986)

Nakamura-T

"Immunomodulation by isoprinosine: effects of in vitro immune functions of lymphocytes"

Clin. and Exp. Immunology 52:67-74, (1983)

Nielsen-P, Beckett-AH

"Metabolism and excretion in man of NN-dimethylamino-isopropanol and p-acetamido-benzoic acid after administration of Isoprinosine"

J. of Pharmacy and Pharmacology 33:549-550, (1981)

Nonnenmacher-H, Illinger-D

"Contrary results on mouse hepatitis virus type 3 susceptibility in A/J mouse hepatocytes of phosphatidylserine treatment and of a hypercholesterolemic diet: no correlation with membrane fluidity levels"

Biochem. and Biophys. Res. 204/3:1299-1304, (1994)

Norris-D, Loh-PC

"Coxsackie virus myocarditis: prophylaxis and therapy with an interferon stimulator"

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1973) 142:133-136

1. Einleitung

Nuzzolo-L, Vellucci-A

"Tissue culture techniques"

Waren H. Green Inc., St.Louis, Miss., USA (1983)

Ochocka-MD

Isoprinosine in the treatment of herpes virus infections"

Folia Haematol. (Leipzig) 111, 343-349 (1984)

Olsen-EGJ

"Morphological aspects of myocarditis and pericarditis"

Eur-Heart-J. 8 (Suppl.J): 11-16 (1987)

Olsen-EGJ

"The role of biopsy in the diagnosis of myocarditis"

in: "Herz" Urban & Schwarzenberg München, Wien, Baltimore 10 (1): 21 ff. (1985)

Ohnishi-H, Kosuzome-H

"Mechanism of host defense suppression induced by viral infection: mode of action of inosiplex as an antiviral agent"

Infection and Immunity 38:243-250, (1982)

Ohnishi-H, Kosuzome-H

"Immunomodulatory action of inosiplex in relation to its effects in experimental viral infections"

Int. J. of Immunopharmacology 5:181-196, (1983)

Pachuta-DM, Togo-Y

Evaluation of isoprinosine in experimental human rhinovirus infection"

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 5:403-408 (1974)

1. Einleitung

Panet-A, Gloge-I, Falk-H

"Mechanisms of herpes simplex virus inhibition by interferon"

in: Kircher-H, Schellekens-H (eds.)

"The biology of the interferon system 1984"

Elsevier Science Publ. B.V. (1985)

Paul-J

"Cell and tissue culture"

Livingstone LTD, 4. Aufl.:418ff. (1970)

Pereira-CA, Steffan-AM

"Increased susceptibility of mice to MHV 3 infection induced by hypercholesterolemic diet"

Immunobiol. 174: 253-265, (1987)

Rezkalla-SH

"Effect of indomethacin in the late phase of coxsackie virus myocarditis, a murine model"

J. Lab. Clin. Med. (1988) 112:118-121

Rezkalla-SH

"Coxsackie virus B3 murine myocarditis: Deleterious effects of nonsteroidal antiinflammatory agents"

J. Lab. Clin. Med. (1986) 107: 393-395

Reyes-M, Lerner-AM

"Coxsackievirus myocarditis: with special reference to acute and chronic effects"

Prog-Cardiovasc-Dis. 27: 373-394 (1985)

1. Einleitung

Robinson-JA, O'Connell-JB

"Myocarditis: Precursor of cardiomyopathy"

The Collamore Press, D.C. Health and Company, Lexington,
Massach., Toronto: 94-95 (1983)

Richardson-PJ

"Immunosuppressive therapy in the management of biopsy

proven acute myocarditis" in: Urban & Schwarzenberg

München, Wien, Baltimore 10 (1):36-43 (1985)

Romeis-B

"Mikroskopische Technik"

Böck-P (ed.) Urban & Schwarzenberg München, Wien, Baltimore
17. Auflage (1989)

Saphir-O

in: Gould-SE (ed.) "Pathology of the heart" Charles C. Thomas

Springfield-Illinois, 2. Aufl.: 779 ff. (1960)

Schultheiss-HP

"Zur Frage der immunsuppressiven Therapie bei Myokarditis und
dilatativer Kardiomyopathie: Eine kritische Bestandsaufnahme"

Z-Kardiol. 78 (6): 349-359 (1989)

Sidman-CL, Marshall-JD, Shultz-LD, Gray-PW, Johnson-HM

"Gamma interferon is one of several direct B cell-maturing lymphokines" Nature 309 (5971): 801-804 (1984)

1. Einleitung

Siegenthaler-W, Kaufmann-W, Hornbostel-H, Waller-HD

(eds.) "Lehrbuch der Inneren Medizin"

G. Thieme Stuttgart, New York, 2. Auflage: 43-62 (1987)

Szigeti-R, Rosen-A

"Studies on leucocyte migration inhibitory factor (LIF)

produced by activated B and T cells"

Lymphokine-Res. 7 (1): 11-20 (1988)

Tsang-KY

"Partial restoration of impaired interleukin 2 production and tac antigen expression in patients with AIDS by isoprinosine treatment"

J. Clin. Invest. 75:1538-1544, (1985)

Tsui-CY, Burch-GE

"Early myocardial lesions in EMC-virus infected mice"

Cardiovasc. Res. (1971) 5:550-557

Tyrrell-DA, Horfall-FL

"Neutralization of viruses by homologous immune serum.

Quantitative studies in factors which affect the neutralization

reaction with Newcastle disease, Influenza A and bacterial virus T3"

J-exp-Med. 97: 845 ff. (1958)

Waldmann-RH

"Therapeutic efficacy of inosiplex in rhinovirus infection"

Ann. N.Y. Acad. Scie. 284, 153-160 (1977)

1. Einleitung

Welsh-RM, Dundon-PL, Eyon-E, Brubaker-J, Koo-G et al.

"Demonstration of the antiviral role of natural killer

cells in vivo with a natural killer cell-specific

monoclonal antibody (NK 1.1)"

Nat-Immun-Cell-Growth-Regul. 9 (2): 112-120 (1990)

Wiesmann-E

"Medizinische Mikrobiologie"

G. Thieme Stuttgart, New York, 6. Aufl.: 257-343 (1986)

Woodruff-JF

"Viral myocarditis"

Am. J. of Path. (1980) 101:444-479

Woodruff-JF

"Involvement of T-lymphocytes in the pathogenesis of coxsackie virus B3 heart disease"

J. Immunol. (1974) 113:1726-1736

Wybran-J

"Inosiplex, a stimulating agent for normal human T-cells and human leukocytes"

J. of Immunology 121: 1184-1187, (1978)

Wybran-J

"Isoprinosine: immunological and clinical effects"

In Fuldenberg/Whitten (eds.), Immunomodulation: new frontiers and advances, 363-374, Plenum Press N.Y. 1984

1. Einleitung

Anhang

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren:

Adler, Amon, Arnold, Aumüller, Aziz, Basler, Beato, Blankenburg, Braasch, Dombrowski, Doss, Egbring, Eschenbach, Friederich, Fuhrmann, Geus, Graul, Gressner, Griss, Haberich, Habermehl, Havemann, Hildebrandt, Hilgermann, Höhl, Huffmann, Ihm, Joseph, Kaffarnik, Kalbfleisch, Kern, Kirchner, Kleinsasser, Knoll, Koch, Kraft, Kuni, Lange, Lennartz, Lorenz, Mannheim, Müller, Oepen, Pohlen, Radsak, Remschmidt, Rodeck, Schmitt, Schüffel, Schulz, Schwert, Siegfried, Siegrist, Slenczka, Thomas, Unsicker, Vohland, v. Wichert, Zelder.

Danksagung

1. Einleitung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Slenczka für die Überlassung des Themas und den hilfreichen und freundlichen Rat mit dem er mir immer zur Seite stand.

Ferner möchte ich den Mitarbeitern des Virologischen- und Immunologischen Institutes für die Unterstützung während der Versuchsreihen danken.

Dr. Lohr gilt mein Dank für die kritische Begleitung meiner Forschungsarbeit.

Meiner Mutter sowie Frau Doris Maul und Frau Kathrin Graichen danke ich für die Erstellung des Manuskriptes sowie das Korrekturlesen der Arbeit.

Besonders danke ich meinem Freund, Herrn Dirk Brähler, für die nächtelange Arbeit an seinem Computer.